

**Genetische Populationsstrukturen und Biogeographie des  
Cyanobakteriums *Microcoleus chthonoplastes***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Nicole Lodders  
aus Hamburg

1. Referent: Prof. Dr. Erko Stackebrandt  
2. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn  
eingereicht am: 25.01.2006  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.05.2006

## **Vorabveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch Herrn Prof. Dr. Erko Stackebrandt, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

**Lodders, N., Stackebrandt, E. und U. Nübel** (2005). Frequent genetic recombination in natural populations of the marine cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Environmental Microbiology* **7**: 434-442.

**Mes, T. H. M., Doeleman, M., Lodders, N., Nübel, U. und L. J. Stal** (2006). Selection on protein-coding genes of natural cyanobacterial populations. *Environmental Microbiology* **8**: 1534-1543.

## **Tagungsbeiträge**

**Lodders, N., Stackebrandt, E. und U. Nübel** (2003). Global dispersal of stromatolite forming bacteria (Vortrag). DFG Kolloquium SPP 1115 "Mars and the Terrestrial Planets". Münster, 20.-21. August 2003.

**Lodders, N., Stackebrandt, E. und U. Nübel** (2004). Genetic recombination in natural populations of the microbial mat forming cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* (Poster). VAAM-Tagung, Braunschweig, 28.-31. März 2004.

**Lodders, N., Stackebrandt, E. und U. Nübel** (2004). Genetic population structure of the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* in hypersaline microbial mats in Baja California, Mexico (Vortrag und Poster). 10<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, ISME-10, Cancun, Mexico, 22.-27. August 2004.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	1
1.2	Mikrobielle Matten	2
1.3	Biogeographie von Cyanobakterien	5
1.4	Populationsgenetik	7
1.5	MLSA und die Bedeutung der ausgewählten Gene	12
1.6	Fragestellung der Arbeit	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Laborbedarf	16
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Geräte	17
2.2	Kulturmedien und Lösungen	18
2.3	Probenahme und Aufbereitung	20
2.4	Anzucht von Kulturen	22
2.5	PCR	26
2.5.1	Ernten der Zellen und Aufbereitung	26
2.5.2	PCR-Primer Entwicklung	27
2.5.3	PCR-Amplifikation	28
2.5.4	Gel-Elektrophorese	29
2.5.5	Aufreinigung der PCR-Produkte	30
2.6	Sequenzierung	30
2.6.1	Cycle Sequencing, Aufbereitung der Proben und Sequenzierung	31
2.7	Auswertung	32
2.7.1	Bearbeitung der Sequenzen und Alignment	32
2.7.2	Phylogenetische Bäume	33
2.7.3	Splittrees	35
2.7.4	Multilocus Sequenzanalyse	36
2.7.5	Koppelungsungleichgewicht, Assoziationsindex	37
2.7.6	Incongruence length difference test (ILD-Test)	38
2.9	Hinterlegung der Sequenzen in der EMBL-Datenbank	39

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1 Primer-Entwicklung für die kulturunabhängige Sequenzierung	40
3.2 Evaluierung der kulturunabhängigen Sequenzierung für die MLSA	41
3.3 Biogeographie und Populationsgenetik	42
3.3.1 Nordsee- und Ostseeregion	42
3.3.1.1 Diversität	42
3.3.1.2 Phylogenie	50
3.3.1.3 Rekombination	51
3.3.2 Baja California	55
3.3.2.1 Diversität	57
3.3.2.2 Ökologische Gradienten und räumliche Verteilung	58
3.3.2.3 Phylogenie	59
3.3.2.4 Rekombination	62
3.3.2.5 Vergleich der Sequenzen von Proben aus dem Pond-system und der Umgebung	64
3.3.3 Weltweiter Vergleich	67
<b>4 Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1 Eignung der kulturunabhängigen Sequenzierung für die MLSA	74
4.2 Diversität und Biogeographie von <i>M. chthonoplastes</i>	75
4.3 Rekombination	80
4.4 Artendiskussion	85
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>106</b>

**Abkürzungen**

bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
I <sub>A</sub>	Assoziationsindex (Index of Association)
ILD-Test	Incongruence length difference test
IGS	Intergenic spacer
ITS	Internal transcribed spacer
MLSA	Multilocus Sequenzanalyse
MLST	Multi locus sequence typing
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PES	Provasoli's Anreicherung für Seewassermedien
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rDNA	ribosomale DNA
rRNA	ribosomale RNA
ST	Sequenztyp
tRNA	transfer RNA
UPGMA	Unweighted pair-group method with arithmetic means





# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 *Microcoleus chthonoplastes*

*Microcoleus chthonoplastes* Thuret gehört zur Gruppe der Cyanobakterien, die früher auch Blau-Grün-Algen genannt und ursprünglich den Algen zugeordnet wurden (Staley et al., 1989). Cyanobakterien sind eine weit verbreitete, heterogene Gruppe ein- und mehrzelliger, gram-negativer, phototropher Bakterien. Sie waren vermutlich die ersten Organismen auf der Erde, die mittels oxygener Photosynthese Sauerstoff produziert haben, der sich dann in der Erdatmosphäre anreichern konnte. Die Photosynthese läuft ähnlich wie bei eukaryotischen grünen Pflanzen ab; als Photosynthesepigmente fungieren Chlorophyll a (in einigen Fällen auch Chlorophyll b) sowie Phycobiline (Phycocyanin und Phycoerythrin). Cyanobakterien kommen in einer Vielzahl von terrestrischen, marinen und Süßwasser-Habitaten vor. Bemerkenswert ist die Fähigkeit einiger Arten, extreme Temperaturen oder Salinitäten zu tolerieren. Sie können daher auch in Habitaten wie heißen Quellen, antarktischen mikrobiellen Matten, hypersalinen Lagunen oder Salzseen wachsen. Aufgrund ihrer hohen Toleranz Austrocknung gegenüber überleben sie in Wüstenböden, Salzpfannen (Sabkhas) und marinen Gezeitenbereichen (Madigan et al., 2003; Staley et al., 1989).

*Microcoleus chthonoplastes* Thuret ist ein weltweit vorkommendes, Filament-bildendes, benthisch-marines Cyanobakterium intertidaler und hypersaliner mikrobieller Matten, das zur Ordnung der Oscillatoriales gehört (Abbildungen 1a und 1b). Das Wort *Microcoleus* setzt sich zusammen aus den griechischen Wörtern ‚mikros‘ für klein und ‚koleos‘ für Hülle, Scheide. Die Trichome, oder Filamente (Ketten von aneinandergereihten Zellen), sind bei *M. chthonoplastes* von einer homogenen, v.a. aus Polysacchariden zusammengesetzten Hülle umgeben. Es befinden sich immer mehrere parallele Trichome gebündelt innerhalb der Hülle. Die Trichome haben einen Durchmesser von 2.5 – 6 µm und spitz zulaufende, konisch geformte Endzellen. *M. chthonoplastes* kann sich auf festen und halbfesten Substraten gleitend fortbewegen und wächst innerhalb eines breiten Spektrums an Salinitäten. Proben für diese Arbeit wurden in Gebieten mit Salinitäten von 0.5% bis zu 15% gesammelt („normales“ Seewasser hat einen Salzgehalt von ungefähr 3.2%).

*M. chthonoplastes* spielt eine wichtige ökologische Rolle in der Bildung und Stabilisierung sowie in der Primärproduktion intertidaler und hypersaliner Matten, in denen es oft auch die dominierende Art ist (Garcia-Pichel et al., 1996; Karsten, 1996; Prufert-Bebout und Garcia-Pichel, 1994; Staley et al., 1989).



**Abbildung 1a**



**Abbildung 1b**

**Abbildung 1a:** Foto einer durch *M. chthonoplastes* dominierten mikrobiellen Matte (Nordnerney, 2002). Foto: Dr. Ulrich Nübel.

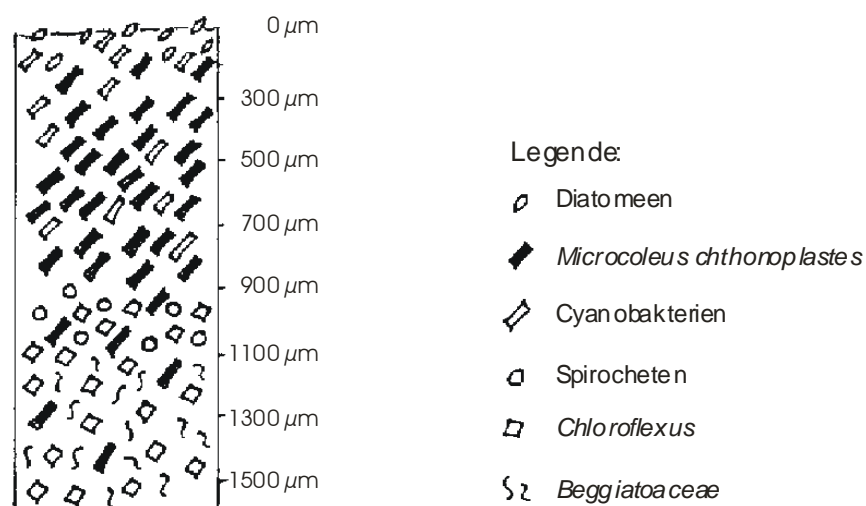
**Abbildung 1b:** Mikroskopaufnahme einzelner Filamente von *M. chthonoplastes* (ca. 200-fache Vergrößerung). Foto: Dr. Ulrich Nübel.

## 1.2 Mikrobielle Matten

Mikrobielle Matten gelten als die ältesten Ökosysteme der Erde. Heute noch als Stromatolithen erhaltene fossile Matten, wie zum Beispiel in West-Australien, sind bis zu 3.5 Milliarden Jahre alt (Guerrero et al., 2002; Guerrero et al., 1993) und geben Aufschluss über Leben auf einer urzeitlichen Erde.

Als mikrobielle Matten werden zusammenhängende, geschichtete Systeme bezeichnet, die aus mikrobiellen Lebensgemeinschaften bestehen und aktiv wachsen. Sie weisen eine extrem hohe Primärproduktion auf, vergleichbar mit einigen der produktivsten Landökosysteme der Erde, und helfen bei der Stabilisierung und Verfestigung von Sedimenten. Mikrobielle Matten kommen vor allem in Küstenzonen vor, aber auch in hypersalinen Lagunen und Seen, heißen

Quellen, alkalinen und sulfatreichen Seen oder an Tiefseeschloten. Die meisten Matten sind einige mm bis cm dick und können Ausdehnungen von bis zu vielen km<sup>2</sup> erreichen. (Guerrero et al., 2002; Guerrero et al., 1993; Karsten und Kühl, 1996). Während im obersten Bereich der Matte bis in ca. 1 mm Tiefe aerobe Bedingungen herrschen, finden sich schon direkt unterhalb der Oberfläche anaerobe Verhältnisse, die zur Konservierung von biogenen Strukturen in der Matte und damit auch zur Stromatolithenbildung beitragen können (D'Amelio et al., 1989). Innerhalb der Matten finden sich einzelne Schichten unterschiedlicher mikrobieller Populationen, die jeweils in ihrer eigenen ökologischen Nische wachsen. In den oberen Lagen sind neben Diatomeen Cyanobakterien, wie z.B. *Microcoleus chthonoplastes* sowie *Lyngbia* sp., *Oscillatoria* sp. oder *Spirulina* sp., anzutreffen, die das Licht für oxygene Photosynthese nutzen und als Pionierorganismen bei der Entstehung und Entwicklung der meisten Mattentypen gelten. Daran anschließend wachsen verschiedene Arten der Schwefelbakterien und Schwefelpurpurbakterien und in der unteren Schicht schließlich sulfat-reduzierende Bakterien (Karsten und Kühl, 1996; Walter, 1976). Im Folgenden wird exemplarisch der Aufbau einer von *Microcoleus chthonoplastes* dominierten Matte aus einer Saline in Guerrero Negro, Baja California, Mexiko (vergleiche Kapitel 4.3.2), näher beschrieben (nach D'Amelio et al., 1987). Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 2 gegeben.



**Abbildung 2:** Schematischer Aufbau einer von *Microcoleus chthonoplastes* dominierten mikrobiellen Matte (eigene Zeichnung, verändert nach D'Amelio et al., 1989).

Direkt an der Oberfläche der Matte siedeln Diatomeen wie z.B. *Nitzschia* und *Navicula* spp. sowie Cyanobakterien wie *Oscillatoria* sp., *Spirulina* sp. und *Synechococcus* sp., die die ersten 0 bis 300 µm dominieren. Diese Organismen sind in der Lage, die direkte Sonneneinstrahlung zu ertragen und für die Photosynthese zu nutzen. *M. chthonoplastes* kann im obersten Bereich der Matte von 50 bis 1200 µm angetroffen werden, in größter Dichte allerdings im Bereich von 300 bis 700 µm. Bei starker Sonneneinstrahlung ist *M. chthonoplastes* nicht direkt an der Oberfläche anzutreffen, da diese Art die direkte Sonneneinstrahlung nicht verträgt. Neben *M. chthonoplastes* kommen in diesem Bereich auch andere Cyanobakterien wie z.B. *Oscillatoria limnetica* oder *O. salina* vor. Ungefähr in 800 bis 1000 µm Tiefe befindet sich die Chemokline, und damit einhergehend verschiebt sich die Artenzusammensetzung von aeroben Cyanobakterien hin zu anaeroben Arten. Auch wenn noch vereinzelt *M. chthonoplastes* und *Synechococcus* sp. Kolonien auftreten, überwiegen im Bereich der Chemokline *Beggiatoaceae* (zu den schwefelhaltigen Bakterien gehörend) und *Chloroflexus*-Arten (zu der Gruppe der grünen schwefelfreien Bakterien gehörend), sowie im Bereich zwischen 1000 und 1500 µm neben *Beggiatoaceae* auch noch eine große Anzahl Spirocheten und anderer heterotropher Organismen.

Auch wenn die Zusammensetzung dieser speziellen Matte nur ein Beispiel ist, ähnelt sie doch dem Aufbau von mikrobiellen Matten allgemein. Je nach Lage und Alter der Matte gibt es neben *M. chthonoplastes* dominierten Matten noch eine Vielzahl anderer Mattentypen, wie zum Beispiel *Lyngbia* dominierte Matten.

Zu den am besten untersuchten mikrobiellen Matten gehören die Matten in Baja California, Mexiko (z. B. Javor und Castenholz, 1981), Solar Lake im Sinai (z. B. D'Amelio et al., 1989), Shark Bay in West-Australien (z. B. Burns et al., 2004), und als wohl eines der größten Mattensystem in Europa das Gebiet um das Ebro-Delta in Spanien (z. B. Guerrero et al., 1993). Aber auch auf den friesischen Inseln an der Nordseeküste (z. B. Gerdes et al., 1985) und den Orkney Inseln im Nordatlantik sind gut untersuchte mikrobielle Matten zu finden (z. B. Wieland et al., 2003).

### 1.3 Biogeographie von Cyanobakterien

Die Biogeographie untersucht die räumliche Verteilung von Lebewesen auf der Erde. Arten, die weltweit vorkommen können, werden als Kosmopoliten bezeichnet, während Endemiten Arten sind, die nur in einem bestimmten Gebiet oder einem begrenzten Lebensraum einheimisch sind (Leser, 1997). In der Vergangenheit hat sich die Biogeographie hauptsächlich mit dem Vorkommen und der Verteilung von Pflanzen (Pflanzengeographie) und Tieren (Tiergeographie) beschäftigt. In der Mikrobiologie ging man dagegen lange Zeit davon aus, dass „alles überall ist und die Natur selektiert“ (Beijerinck, 1913, Baas-Becking, 1934, beide zitiert in Staley und Gosink, 1999). Bakterien sind nach diesem Ansatz Kosmopoliten. Ähnliche Lebensräume auf der Erde werden von den gleichen Arten besiedelt und geographische Isolierung kommt nicht vor. In den letzten Jahren wurde dieser Ansatz allerdings durch Untersuchungen, die sich bei freilebenden Arten vor allem auf Cyanobakterien konzentrierten, in Frage gestellt und lebhaft diskutiert (Staley und Gosink, 1999). Auch wenn kosmopolitische Bakterien und Archaeen durchaus verbreitet sind, spricht inzwischen vieles dafür, dass die weltweite Verteilung von Mikroorganismen wesentlich differenzierter ist als vormals angenommen. Am besten untersucht sind diesbezüglich mikrobielle Matten in heißen Quellen unterschiedlicher geographischer Regionen. Diese Gebiete eignen sich besonders für biogeographische Untersuchungen, da es sich um extreme Lebensräume handelt, die sich von ihrer Umgebung stark unterscheiden und dadurch voneinander isoliert sind.

Castenholz (1996) hat festgestellt, dass thermophile Cyanobakterien, die in heißen Quellen in temperaten Klimazonen in Nord-Amerika vorkommen, nicht in den heißen Quellen Alaskas und Islands zu finden waren, obwohl sie auch dort zu erwarten wären. Als Gründe dafür wurden zum einen die weite Entfernung zwischen den heißen Quellen angegeben und die völlig anderen Lebensbedingungen in den Gebieten zwischen den Quellen, zum anderen die relativ kurze Zeitspanne seit sich das Eis der letzten Eiszeit vor ungefähr 10 000 Jahren zurückgezogen hat und die Organismen die Möglichkeit zur Ausbreitung nach Norden hatten.

Papke et al. (2003) untersuchten Populationen des einzelligen Cyanobakteriums *Synechococcus* und Cyanobakterien-Gemeinschaften in heißen Quellen in vier verschiedenen Ländern beziehungsweise Kontinenten (Nord-Amerika, Japan, Neuseeland und Italien). Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Arten in den

unterschiedlichen Ländern genotypisch unterscheiden. Zwanzig chemische Parameter, die gleichzeitig untersucht wurden, konnten nicht als Ursache für Unterschiede herangezogen werden. Die Autoren schließen daraus, dass geographische Isolation und Adaption die entscheidenden Faktoren für die Verteilung und Variation thermophiler Cyanobakterien sind.

Neben geographischer Isolation können allerdings auch ökologische Faktoren für eine räumliche Verteilung und Trennung von Populationen oder auch Arten verantwortlich sein. Durch unterschiedliche ökologische Ansprüche kommt es zu Spezialisierung und Nischenbildung. So ist für *Synechococcus* das Vorkommen verschiedener Populationen entlang eines vertikalen Lichtgradienten in heißen Quellen im Yellowstone Nationalpark beobachtet worden (Ferris et al., 2003), ebenso wie entlang thermaler Gradienten (Ward et al., 1998).

In hypersalinen Lebensräumen, wie in der gut untersuchten Saline in Baja California, Mexiko, konnte das Vorkommen unterschiedlicher bakterieller Gemeinschaften und Populationen entlang eines Salinitätsgradienten beobachtet werden (Nübel et al., 2001; Nübel et al., 2000).

Geographische Barrieren und Isolation wurden außer für Cyanobakterien auch für andere Bakterienarten wie zum Beispiel Bodenbakterien (Fulthorpe et al., 1998) sowie für Archaeen (Whitaker et al., 2003) beschrieben.

Whitaker et al. (2003) haben mittels Sequenzanalyse von 9 Genloci Populationen der hyperthermophilen Archaeengattung *Sulfolobus* aus fünf geographischen Regionen untersucht und festgestellt, dass die Populationen aller fünf Regionen eigene phylogenetische Cluster bilden und somit räumlich wie auch genetisch voneinander getrennt sind.

Untersuchungen des 16S rRNA Gens und der Morphologie von Filamentbündeln und Kulturen von *M. chthonoplastes* aus sieben geographisch voneinander entfernten Sammelstandorten deuten darauf hin, dass *M. chthonoplastes* ein kosmopolitisches Cyanobakterium ist (Garcia-Pichel et al., 1996). Die Proben zeigten eine bemerkenswerte Ähnlichkeit und so gut wie keine Sequenzunterschiede, auch zwischen geographisch weiter voneinander entfernten Standorten.

Allerdings erwähnten Palys et al. (1997) in ihren Untersuchungen über ökologische Diversität, dass das hoch konservierte 16S rRNA Gen nur bedingt geeignet ist, um nah verwandte, aber ökologisch getrennte Gruppen von Bakterien zu unterscheiden.

Stattdessen sollten protein-kodierende Gene verwendet werden, die eine höhere Auflösung auf Sequenzebene besitzen.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass *M. chthonoplastes* eine wesentlich höhere genomische Diversität besitzt als ursprünglich angenommen. Innerartliche Diversität, die durch 16S rRNA Gen-Analysen nicht zu erkennen ist, kann durch die Verwendung von Haushaltsgenen und Spacer-Regionen wie der ITS-Region aufgezeigt werden.

Auch wenn immer neue Erkenntnisse über die Biogeographie von Mikroorganismen gewonnen werden, ist immer noch nur sehr wenig bekannt über die Mechanismen der Ausbreitung. Eine wichtige Rolle spielen die Verbreitungsstrategien und die Fähigkeit des Organismus, längere Zeit in für ihn unbesiedelbaren Lebensräumen zu überleben. Kosmopolitische Organismen müssen in der Lage sein, neue Orte besiedeln zu können, auch über weite Entfernungen hinweg. Bei weltweit vorkommenden Arten kann es durchaus vorkommen, dass die gesamte weltweit vorhandene Variation gleichzeitig auch als Variation innerhalb einer lokalen Population zu finden ist (Maynard Smith, 1995). Die teilweise hohe Variabilität innerhalb der Populationen sowie die Fähigkeit ungünstige Bedingungen längere Zeit zu überleben führen dazu, dass Mikroorganismen sich schnell an neue Standorte anpassen und sich dort ausbreiten können.

Über Verbreitungsstrategien von *Microcoleus chthonoplastes* ist wenig bekannt. Da diese Art aber überwiegend in intertidalen Küstenregionen oder hypersalinen küstennahen Regionen vorkommt, ist die Verbreitung über Meeresströmungen naheliegend. Eine weitere wichtige Rolle könnten die Verbreitung durch Meeres- und küstenbewohnende Tiere und die Verbreitung durch den Menschen spielen.

## 1.4 Populationsgenetik

Die Populationsgenetik untersucht die genetische Variabilität natürlicher Populationen. Sie ist dabei eng mit der Evolutionsbiologie verknüpft, da genetische Variationen in Populationen sich immer auch auf die Entstehung und Entwicklung von Arten auswirken können. Die genetische Variabilität von Populationen ist

besonders in der Mikrobiologie von Bedeutung, da aufgrund der kurzen Generationszeiten und der Populationsgrößen von Mikroorganismen evolutionäre Änderungen schnell vollzogen werden und entscheidende Bedeutung auch für den Menschen haben können, wie zum Beispiel die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen von pathogenen Bakterien zeigen (Maynard Smith, 1995). Dementsprechend wurden bis heute überwiegend Populationen pathogener aber auch agrarwissenschaftlich relevanter Mikroorganismen untersucht.

Populationsgenetische Theorien, die für höhere Organismen aufgestellt wurden, lassen sich dabei nicht ohne weiteres auf Mikroorganismen übertragen. Populationsstrukturen von Mikroorganismen sind oft komplex und kontrovers. Die Annahme der klassischen Populationsgenetik, dass zwischen den Individuen freie Rekombination vorkommt, kann nicht ohne weiteres auf Mikroorganismen übertragen werden. Während Rekombination in Bakterien durchaus vorkommt, tritt sie dennoch zu selten auf, um von vornherein davon ausgehen zu können, dass die Allele eines Locus unabhängig von den Allelen eines anderen Locus wären. Gerade über Häufigkeit und Einfluss der Rekombination in Mikroorganismen herrschen immer noch Unsicherheiten. Entscheidend ist dabei auch die Bestimmung des Verhältnisses von Rekombinationsraten zu Punktmutationen. Populationen können neue, vorteilhafte Mutationen durch Selektion fest im Genpool verankern. Aufgrund der Koppelung der Allele des Genoms bei fehlender Rekombination kommt es zur Homogenisierung der gesamten Population für alle Merkmale und nicht nur für den durch Mutation veränderten Genlocus (Feil und Spratt, 2001; Maynard Smith, 1995). Durch Rekombination können vorteilhafte Mutationen in der Population verteilt werden, während die Vielfalt innerhalb der anderen Gene erhalten bleiben kann. Durch Rekombination wird daher die Variabilität einer Population aufrechterhalten bzw. erhöht. Damit ist sie ein wichtiger evolutionärer Faktor.

### **Rekombination**

Das Vorhandensein von Rekombination und die Häufigkeit von Rekombinationsereignissen sind abhängig von einer Vielzahl biologischer und ökologischer Faktoren. Rekombinationsraten sind schwer zu identifizieren, da sie zwischen Arten und teilweise auch Unterarten oder zwischen Populationen variieren (Feil und Spratt, 2001). Auch wenn sowohl sehr geringe Rekombinationsraten von nahezu null als auch sehr hohe Raten möglich sind, haben die meisten Bakterien



eine mittlere Rekombinationsrate, die zwar für die Evolution von Populationen hoch signifikant ist, aber nicht hoch genug, um das Auftreten klonaler Linien zu verhindern (Spratt und Maiden, 1999).

Grundsätzlich kann zwischen klonalen, epidemischen und panmiktischen Populationen unterschieden werden. Ein Klon ist ein Set genetisch ähnlicher Zellen, die von einem gemeinsamen Vorfahr stammen, ohne dass chromosomale Rekombination auftritt (Maynard Smith, 1995). Klonale Populationen zeigen keinen beziehungsweise nur geringen genetischen Austausch zwischen Individuen. Die Rekombinationsrate ist nicht groß genug, um Genome zu randomisieren und klonale Assoziationen von Allelen aufzubrechen; die Allele befinden sich in einem Koppelungsungleichgewicht. Typische Vertreter einer klonalen Art sind *Salmonella enterica* (Maynard Smith et al., 1993) oder auch *Staphylococcus aureus* (Cohan, 2004).

Demgegenüber stehen panmiktische Populationen mit einer hohen Rekombinationsrate und einer zufälligen Assoziation von Allelen zwischen den Loci. In panmiktischen Populationen herrscht ein Koppelungsgleichgewicht vor. Aber auch in Populationen mit hoher Rekombinationsrate können klonale Gruppen vorkommen. Zu den panmiktischen Arten gehören *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori* oder *Porphyromonas gingivalis* (Koehler et al., 2003; Spratt und Maiden, 1999; Maynard Smith et al., 1993).

Epidemische Populationen schließlich sind eigentlich panmiktisch, durch eine kürzliche, plötzliche Zunahme eines Genotyps ist allerdings eine signifikante Assoziation zwischen den Loci vorhanden, die auf eine klonale Population schließen lassen würde. Durch Rekombination geht das Vorherrschen dieses einen Genotyps wieder verloren. Eine epidemische Populationsstruktur wurde beispielsweise bei *Neisseria meningitidis* beobachtet (Maynard Smith et al., 1993).

Bei dem Bodenbakterium *Rhizobium meliloti* kommen genetisch isolierte Divisionen vor, innerhalb derer Rekombination häufig ist, zwischen denen allerdings kein Genaustausch stattfindet. Betrachtet man die Art als Ganzes hat es daher den Anschein, als wäre Rekombination selten (Maynard Smith et al., 1993).

Auch in Arten mit hoher Rekombinationsrate ist diese im Vergleich zu den meisten Eukaryoten sehr niedrig. Die durchschnittliche Rekombinationsrate für ein bestimmtes Gensegment ist normalerweise nicht wesentlich größer als dessen

Mutationsrate (Cohan, 2002a; Roberts und Cohan, 1995). *Neisseria meningitidis*, eine panmiktische Art hat eine Rekombinationsrate, die 3.6 mal höher ist als die Mutationsrate, *Staphylococcus aureus*, eine klonale Art, hat eine Rekombinationsrate, die drei mal niedriger ist als die Mutationsrate. Da Rekombination mehr Nukleotide beeinflusst als Punktmutation, kann die Rekombinationsrate in bezug auf ein einzelnes Nukleotid bis zu 80-mal höher sein als die Mutationsrate (Cohan, 2004).

Homologe Rekombination bezeichnet den Austausch eines DNA-Abschnittes durch einen anderen mit gleicher oder ähnlicher Nukleotidsequenz. Es wird daher eine relativ hohe Sequenzähnlichkeit des auszutauschenden Genabschnittes zwischen Donor und Empfänger benötigt. Allerdings wurde auch zwischenartliche Rekombination mit Nukleotidunterschieden bis zu 25 – 30% beobachtet (Feil und Spratt, 2001).

Es können drei Arten des Genaustausches bei Bakterien unterschieden werden: Transduktion, Konjugation und Transformation.

Transduktion ist die Übertragung von DNA von einer Bakterienzelle zur nächsten durch Bakteriophagen, Viren die Bakterien angreifen. Es kann vorkommen, dass in einen Bakteriophagen, der eine Zelle infiziert, fälschlicherweise anstelle des viralen Genoms die bakterielle chromosomale DNA gepackt wird. Infiziert der Phage anschließend die nächste Zelle, kann die DNA durch homologe Rekombination in das Genom des Empfängers eingebaut werden (Madigan et al., 2003).

Phagen, die Cyanobakterien infizieren, werden Cyanophagen genannt. Cyanophagen wurden zum Beispiel für das marine Cyanobakterium *Prochlorococcus* nachgewiesen (Sullivan et al., 2003) und für *Synechococcus* von Mann (2003) genauer beschrieben.

Bei der Konjugation wird die DNA mittels Plasmiden oder Transposons direkt von Zelle zu Zelle transferiert. Die DNA des Donors kann in ein infizierendes Plasmid integriert werden, zum Beispiel durch Einbau des Plasmids in das Chromosom der Bakterienzelle und anschließender Wiederfreisetzung. Wenn das Plasmid mittels einer Brücke (Pilus) die Zelle wechselt, kann die bakterielle DNA in die Empfängerzelle gelangen (Madigan et al., 2003).

Transformation beschreibt die aktive Aufnahme von freier DNA aus der Umgebung. Mittels homologer Rekombination kann die DNA anschließend in das Bakteriengenom integriert werden. Um die DNA aufnehmen zu können, muss die Bakterienzelle kompetent sein. Einige Arten, zum Beispiel *Bacillus subtilis* oder *Neisseria gonorrhoeae* sind natürlicherweise kompetent, während andere wie *Escherichia coli* erst kompetent gemacht werden müssen. Zu den von Natur aus kompetenten Zellen gehören auch häufig Bakterien aus dem Boden oder Wasser (Madigan et al., 2003)

Transformation bei Cyanobakterien wurde unter anderem für *Synechococcus* (Lorenz und Wackernagel, 1994) und für *Synechocystis* (Barten und Lill, 1995) beschrieben.

Transduktion, Konjugation und Transformation resultieren alle in einem lokalisierten, in eine Richtung ausgerichteten Genaustausch. Der Austausch kann sich in Größenordnungen von einigen 1000 Basenpaaren in natürlicher Transformation über einige 10000 Basenpaare bei der Transduktion bis hin zu einigen 100000 Basenpaare bei der Konjugation bewegen (Spratt et al., 2001).

Rekombination in Bakterien kann mittels Nukleotidsequenzen auf mehrere Arten festgestellt werden. Eine Möglichkeit ist die Sequenzierung mehrerer Gene der gleichen Individuen und die Berechnung phylogenetischer Bäume für die einzelnen Gene. Inkongruenzen zwischen den Bäumen können durch Rekombination verursacht worden sein. Das Ausmaß phylogenetischer Kongruenz zwischen Bäumen verschiedener Loci spielt besonders bei taxonomischen Vergleichen eine Rolle, wo robuste Phylogenien benötigt werden. Um in nicht-klonalen Populationen aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, kann es daher sinnvoller sein, Netzwerke anstelle von klassischen Bäumen zu erstellen (Feil und Spratt, 2001; Spratt und Maiden, 1999). Rekombination kann außerdem durch das Ausmaß der Koppelung zwischen Allelen verschiedener Loci innerhalb einer Population ermittelt werden (s. Punkt 3.8.5) (Feil und Spratt, 2001; Maynard Smith, 1995).

Der Frage nach Rekombination in Cyanobakterien wurde erst in jüngerer Zeit nachgegangen. Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass Rekombination in den untersuchten Arten vorhanden ist. Barker et al. (2000) haben mittels Allel-spezifischer PCR gezeigt, dass Rekombination in dem filamentbildenden Cyanobakterium *Nodularia* innerhalb des Untersuchungsgebietes in der Ostsee

vorkommt. Des Weiteren konnte Rekombination für *Microcystis* (Tanabe et al., 2004; Rudi et al., 1998), *Nostoc*, *Planktothrix*, *Tychonema* (Rudi et al., 1998) und *Arthrospira* (Manen und Falquet, 2002) nachgewiesen werden.

## **1.5 MLSA und die Bedeutung der ausgewählten Gene**

Bei der Multilocus Sequenzanalyse (MLSA) werden die Sequenzen mehrerer Gene miteinander verglichen, um Aussagen über die Populationsgenetik und Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb oder auch zwischen verschiedenen Arten machen zu können. MLSA hat sich aus dem multilocus sequence typing (MLST) entwickelt, um phylogenetische Analysen durchführen zu können.

MLST wurde ursprünglich von Maiden et al. (1998) entwickelt, um Populationsstrukturen und Epidemiologie von pathogenen Mikroorganismen zu untersuchen. Anstelle eines Gens werden durchschnittlich vier bis acht Haushaltsgene mit einer Fragmentlänge von je ca. 450 bis 500 Basenpaaren sequenziert und miteinander verglichen. Haushaltsgene kodieren Proteine, die für den Metabolismus der Zelle wichtig sind. Sie weisen eine höhere Variabilität auf als hoch konservative Gen-Regionen wie zum Beispiel das 16S rRNA Gen, sind aber nicht so hoch variabel wie Gene, die eine hohe Evolutionsrate haben, zum Beispiel Gene für Antibiotikaresistenz oder Spacer-Regionen. Da MLST speziell für die molekulare Epidemiologie entwickelt wurde und für die Analyse nur miteinander vergleichbare Haushaltsgene verwendet werden, ist dieser Begriff für die Methodik dieser Arbeit zu eng gefasst. Es wird daher der allgemeinere Ausdruck MLSA verwendet.

In dieser Arbeit wurden die Haushaltsgene *kaiC* und *petB/D* (einschließlich der Spacer-Region zwischen *petB* und *petD*) sowie ein Teil des 16S rRNA Gens mit der daran anschließenden ITS-Region untersucht. Die Untersuchung von Haushaltsgenen und hochvariabler Regionen eignet sich besonders gut für innerartliche Vergleiche, da das hochkonservative 16S rRNA Gen, das in der Taxonomie bevorzugt verwendet wird, auf der Ebene der Art eine eher geringe Auflösung hat und daher nur bedingt für diesbezügliche Analysen innerhalb einer Art geeignet ist. Durch die Analyse mehrerer Gene sowie das Erstellen und Vergleichen mehrerer phylogenetischer Bäume kann deren Kongruenz untersucht und Aussagen

über Rekombination gemacht werden. Im Folgenden wird auf die Gene und deren Bedeutung näher eingegangen.

### **rDNA-ITS Region**

Die 16S rRNA Gene der ribosomale RNA sind wichtige Komponenten der Proteinsynthese (Ward et al., 1992) und gehören seit den Arbeiten von Carl Woese in den 70er Jahren zu den bedeutendsten und am häufigsten genutzten Genen für phylogenetische Analysen (Madigan et al., 2003). Die 16S rRNA ist ein Teil der rRNA, die aus drei ribosomalen RNA-Molekülen besteht (5S, 16S, und 23S) sowie aus hochvariablen Spacer-Regionen. Ribosomale RNA eignet sich besonders gut für phylogenetische Vergleiche zwischen Arten, da sie in allen Organismen vorkommt, in ihrer Funktionalität konstant ist, eine ausreichende Größe aufweist und sowohl hoch konservative Regionen als auch ausreichend Sequenzvariabilität in anderen Regionen besitzt um auf dieser Basis phylogenetische Verwandtschaften aufzuzeigen (Madigan et al., 2003; Woese, 1987). Das 16S rRNA Gen wird heute routinemäßig mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert; dementsprechend ist das rRNA Gen mit > 190 000 Sequenzen in Datenbanken wie dem Ribosomal Database Project (RDP; Stand Dezember 2005 (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)) das am intensivsten untersuchte Gen in der Biologie (Cole, 2005).

Auch für Cyanobakterien wurden Primer für das 16S rRNA Gen entwickelt (Nübel et al., 1997) und inzwischen sind eine Vielzahl an 16S rRNA Gen-Sequenzen in den Datenbanken vorhanden. Das 16S rRNA Gen von *Microcoleus chthonoplastes* wurde zum Beispiel von Garcia-Pichel et al. (1996) analysiert. In Cyanobakterien wurden, wie für andere Arten auch, mehrere rRNA-Operons in einem Stamm gefunden (Boyer et al., 2001). Da das 16S rRNA Gen hoch konservativ ist, eignet es sich aufgrund der geringen Sequenzvariabilität nur bedingt für innerartliche Vergleiche. Für diese Arbeit wurde daher zusätzlich ein Teil der ITS (= internal transcribed spacer), die an das 3' Ende des 16S rRNA Gens anschließt, zusammen mit dem 16S rRNA Gen sequenziert und analysiert.

Die ITS-Region befindet sich in dem rRNA-Operon zwischen dem 16S rRNA Gen und dem 23S rRNA Gen. Aufgrund ihrer hohen Variabilität auch zwischen Individuen einer Art eignet sie sich besonders gut für Untersuchungen zu

Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb einer Art. In der ITS-Region können sich ein oder mehrere tRNA-Gene befinden. In Cyanobakterien gibt es Arten mit ITS-Regionen, die tRNA<sup>ile</sup> und tRNA<sup>ala</sup> enthalten sowie Arten, deren ITS-Region nur tRNA<sup>ile</sup> oder keine tRNA-Sequenzen enthalten. Für Cyanobakterien wurden inzwischen eine Vielzahl von Analysen der ITS-Region durchgeführt (aufgezählt z. B. in Itean et al., 2000; Boyer et al., 2001). Die Länge der ITS-Region kann in Cyanobakterien um 200 Nukleotide variieren; die Größenordnung beträgt ungefähr 350 bis 550 Nukleotide (Itean et al., 2000). *M. chthonoplastes* besitzt eine hochvariable ITS-Region, die nach einer Länge von 119 Nukleotiden ein tRNA<sup>ile</sup> Gen enthält. Diese konservative Region, mit einer Länge von 75 Nukleotiden, weist nur eine sehr geringe Variabilität auf (diese Arbeit).

### ***kaiC***

*kaiC* gehört zu dem *kaiABC*-System, das eine entscheidende Funktion in der Kontrolle des Tagesrhythmus bei Cyanobakterien ausübt (Lorne et al., 2000). Cyanobakterien sind vermutlich die einfachsten Organismen mit diesem Rhythmus. Die *kai*-Gene, die an dem Cyanobakterium *Synechococcus* zum ersten Mal beschrieben wurden, sind für die Erhaltung des Tageszeitenrhythmus in Cyanobakterien essentiell und regulieren sich selbst mittels ihrer Gen-Produkte. Die Überproduktion von KaiC verhindert dabei mittels negativen Feedbacks die weitere Expression der *kai*-Gene (Ishiura et al., 1998).

Lorne et al. (2000) schließen aus ihren Untersuchungen, dass eine Vielzahl von Cyanobakterien das Gen *kaiC* oder dessen Homolog besitzt. Da *kaiC* auch auf innerartlicher Ebene eine relativ hohe Sequenzvariabilität aufweist, wurde dieses Gen für die Multilocus Sequenzanalyse in dieser Arbeit ausgewählt.

### ***petB/D***

*petB* und *petD* gehören zu dem Cytochrom b<sub>6</sub>f-Komplex, der ein Teil der photosynthetischen Elektronentransportkette ist und die beiden Photosysteme PS I und PS II miteinander verbindet. In Cyanobakterien spielt der Komplex außerdem eine wichtige Rolle in der Atmungskette (Schneider et al., 2000). Der Cytochrom b<sub>6</sub>f-Komplex besteht aus vier Proteinen, PetA bis PetD. *petA* kodiert Cytochrom f, *petB* Cytochrom b<sub>6</sub>, *petC* das Rieske FeS-Protein und *petD* die Untereinheit IV Polypeptide (Schneider et al., 2000; Urbach et al., 1998).

In Cyanobakterien formen *petB/petD* ein Operon (ebenso wie *petC/petA*) und umschließen einen hochvariablen Spacer. Aufgrund der hohen Variabilität insbesondere der Spacer-Region wurde das *petB/D* Operon in dieser Arbeit für die MLSA ausgewählt. Aufgrund der verwendeten Primer wurden eine Teilregion von *petB* und dem daran anschließenden Spacer (*pet*-IGS) sequenziert.

## 1.6 Fragestellung der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur genetischen Populationsstruktur und Biogeographie des Cyanobakteriums *Microcoleus chthonoplastes*. Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie hoch ist die genetische Diversität innerhalb *M. chthonoplastes*?
- Inwieweit unterscheiden sich Individuen dieser Art genetisch auf lokaler, regionaler und globaler Ebene?
- Gibt es Unterschiede in der Diversität in Bezug auf die Standortbedingungen?
- Kommen mehrere Populationen dieser Art nebeneinander vor?
- Gibt es Rekombination zwischen Individuen dieser Art und sind Unterschiede bei Individuen gleicher Populationen, unterschiedlicher Populationen oder unterschiedlicher Regionen erkennbar?

Zu diesem Zweck wurde eine kultivierungsunabhängige Methode entwickelt, mittels derer einzelne Filamente von *M. chthonoplastes* ohne das Anlegen von Kulturen direkt amplifiziert und sequenziert werden konnten. Auf diese Weise konnte für verschiedene Standorte eine große Anzahl Individuen untersucht und miteinander verglichen werden. Ebenso wurden neue Kulturen angelegt, die morphologisch mit vorhandenen *M. chthonoplastes* Kulturen verglichen werden konnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Laborbedarf

#### 2.1.1 Chemikalien

10 x Puffer mit Magnesiumchlorid (zusammengesetzt aus 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl und 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	Roche
Ammoniumeisen-II-sulfat Hexahydrat (Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O)	Merck
d-Biotin (Vitamin H)	Sigma
Borsäure H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Merck
Bromphenolblau	Sigma
CEQ™ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Master Mix	Beckman Coulter
CEQ™ Sample Loading Solution	Beckman Coulter
CEQ™ Separation Gel	Beckman Coulter
CEQ™ Sequencing Separation Buffer	Beckman Coulter
Desoxynukleosid-Triphosphat (dNTPs)	Roche
Dinatrium Ethylendiamintetraessigsäure (Na <sub>2</sub> EDTA)	Sigma
DNA-Längenstandards III und VIII	Roche
Eisen-(III)-chlorid (FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O)	Sigma
Ethanol, absolut, unvergällt	J.T. Baker
Ethidiumbromid (5 mg/ml)	Roche
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Glycerin	Sigma
β-Glycerinphosphat Dinatriumsalz Pentahydrat (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> PNa <sub>2</sub> * 5H <sub>2</sub> O)	Sigma
Glycogen (20 mg/ml)	Beckman Coulter; Roche
Kobaltsulfat (CoSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O)	Merck
Mangansulfat (MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O)	Sigma
Mineralöl	Beckman Coulter
Natriumacetat, 3 M	Sigma



Natriumnitrat ( $\text{NaNO}_3$ )	Sigma
Natronlauge ( $\text{NaOH}$ )	Merck
Nujol Mineralöl	Applied Biosystems
Oligonukleotid-Primer	Metabion; eurogentec
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Salzsäure ( $\text{HCl}$ )	Merck
SeaKem LE Agarose	Biozym
SeaSalts	Sigma
Taq DNA Polymerase, 250 units	Roche
Thiamin (Vitamin B1)	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIZMA Base)	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid (Tris HCl)	Sigma
Vitamin B12	Sigma
Zinksulfat ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma

Destilliertes Wasser

Zweifach-destilliertes Wasser

### 2.1.2 Geräte

Sequencer CEQ 8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter
Zentrifuge 5415D; 5415C	Eppendorf
Analyse-Waage	Sartorius
pH-Meter 765 Calimatic	Knick
Mikrowelle R212D	Sharp
Gel-Elektrophorese: Horizon 11-14 Gel Casting System, Pufferkammer	GIBCO BRL
Electrophoresis Power Supply EPS 200	Pharmacia Biotech
Power Supply LKB 2301 Macrodrive 1	LKB Bromma
PCR: DNA Thermal Cyclers 480; GeneAmp PCR-System 9600	Perkin Elmer

Mini-Shaker MS 1 (Mini-Schüttler)	IKA-Works, Wilmington, NC, USA
MaxiCycler PTC-100™	Biozym
Mastercycler gradient	eppendorf
Varioklav Dampfsterilisator	H + P
Pipetten 0.5 – 10 µl	eppendorf
20 – 100 µl	Gilson
200 – 1000 µl	Gilson

## 2.2 Kulturmedien und Lösungen

### Provasoli's Anreicherung für Seewassermedien (PES) nach Starr und Zeikus (1987)

#### Stammlösungen:

Lösung 1	$\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{PNa}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5 g / 100ml
Lösung 2	$\text{NaNO}_3$	35 g / L
Lösung 3	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,4 g / L
	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	1,32 g / L
Lösung 4	Vitamin B12	4,07 mg / 100ml
	Thiamin	200 mg / 100ml
	d-Biotin	2 mg / 100ml
Lösung 5	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	5 g / L
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	5,6 g / L
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	240 mg / L
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	600 mg / L
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	110 mg / L
	$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	24 mg / L

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Lösungen 1 bis 3 wurden nach dem Ansetzen autoklaviert, Lösungen 4 und 5 sterilfiltriert. Lösung 4

wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und erst vor Gebrauch sterilfiltriert, alle anderen Lösungen wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

**PES-Lösung:**

8 ml Lösung 1	
80 ml Lösung 2	
100 ml Lösung 3	
2 ml Lösung 4	
40 ml Lösung 5	auf 1 Liter mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auffüllen

Die PES-Lösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahren.

**½ PES-Medium für Cyanobakterien mit 3,5% Salzgehalt**

35 g SeaSalt wurden auf 1 Liter mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgefüllt und gelöst. Der Salzgehalt wurde mit einem Refraktometer überprüft und das Medium anschließend filtriert. Mit einer 1N HCl-Lösung wurde ein pH-Wert von 3 eingestellt und die Lösung danach über Nacht, mindestens aber für 4 – 6 Stunden entgast. Mit einer 2N NaOH-Lösung wurde ein pH Wert von 8.0 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Bei festem Medium wurde vor dem Autoklavieren 10 g Agarose pro Liter hinzugegeben. Nach dem Abkühlen der Lösung wurden auf jeden Liter Lösung 10 ml PES-Lösung gegeben. Das fertige ½ PES-Medium wurde anschließend bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

**TE-Puffer:**

10 mM Tris Cl	1,576 g / L
1 mM EDTA	0,372 g / L

pH-Wert auf 8.0 einstellen

**10 x TBE:**

TRIS	107,8 g / L
$\text{H}_3\text{BO}_3$	55,0 g / L
EDTA	7,4 g / L

Verdünnen auf 1 x TBE: 1 Liter 10 x TBE auf 10 Liter bidestilliertes Wasser geben

### **1%iges Agarosegel**

1 g Agarose

100 ml 1 x TBE-Puffer erhitzen und anschließend

3 µl Ethidiumbromid zugeben.

### **Ladepuffer**

Glycerin	3 ml
0,5 M EDTA	2 ml
Bidest. H <sub>2</sub> O	5 ml
Bromphenolblau	eine Spatelspitze

### **Marker**

DNA-Längenstandard (6,25 µg)	25 µg
TE-Puffer	225 µl
Ladepuffer	50 µl

## **2.3 Probenahme und Aufbereitung**

Für kulturunabhängige Untersuchungen wurden Proben von *M. chthonoplastes* in folgenden Gebieten gesammelt:

- Norderney, deutsches Wattenmeer

Die Proben wurden an fünf Standorten auf der dem Wattenmeer zugewandten, östlichen und südöstlichen Seite der Insel im Mai 2002 gesammelt; Salzgehalt des Meerwassers zu diesem Zeitpunkt 2.2 – 3.5%

- Nahe Fedderwardersiel, deutsche Nordseeküste

Die Proben wurden im Juli 2002 von Maike Meemken gesammelt; Salzgehalt des Meerwassers ungefähr 3.5%

- Mellum, deutsches Wattenmeer

Die Proben wurden im Oktober 2004 von Dr. Andrea Wieland gesammelt; Salzgehalt des Meerwassers zu diesem Zeitpunkt 3.2%

- Wismarer Bucht, deutsche Ostseeküste

Die Proben wurden nahe Redentindorf im September 2004 gesammelt; Salzgehalt des Meerwassers zu diesem Zeitpunkt 1.9%

- Varberg, Südwestküste Schweden

Die Proben wurden an vier verschiedenen Standorten an der Ostseeküste in Südwest-Schweden, nördlich von Varberg, im August 2002 und August 2003 gesammelt; Salzgehalt des Meerwassers 1.7 – 2.2%

- Costa Brava, spanische Mittelmeerküste

Die Proben wurden 2002 von Dr. Ulrich Nübel gesammelt; sie stammen aus einem zumindest vorübergehend ausgetrockneten Gebiet und wurden vor der Bearbeitung in 3.5%  $\frac{1}{2}$  PES-Medium aufgeweicht

- Guerrero Negro, Baja California Sur, mexikanische Pazifikküste

Die Proben wurden im September 2002 in der Saline der Exportgesellschaft Exportadora de Sal gesammelt; sie stammen aus fünf Anreicherungsponds (Salinität von 7 – 15%) sowie aus den in der Saline vorkommenden Salzmarschen (Salinität von 4.5 – 15%) und von einem Sammelort nördlich der Saline bei Guerrero Negro an der Pazifikküste (Salzgehalt 7%)

- San Diego Bay, kalifornische Pazifikküste

Die Proben wurden an zwei Standorten in einer Pazifikbucht bei San Diego im September 2002 gesammelt; Salzgehalt des Meerwassers zu diesem Zeitpunkt 5%

### **Aufbewahrung der Proben**

Von jedem der Standorte wurden ein oder mehrere Mattenstücke mit einem Oberflächendurchmesser von durchschnittlich 3 – 5 cm genommen und für den Transport in Schraubdeckelgefäßen aus Plastik aufbewahrt. Aus den Proben wurden anschließend Kulturen angezogen (siehe 3.5) oder direkt Filamente für die PCR verwendet (siehe 3.6.1). Ein Teil der Proben wurde direkt nach der Probeentnahme (maximal zwei Wochen später) eingefroren. Während sich die eingefrorenen Proben nicht mehr zur Anzucht von Kulturen eigneten, konnten trotzdem noch Filamente für die kulturunabhängige PCR und anschließende DNA-Analyse entnommen werden.

## 2.4 Anzucht von Kulturen

Um Kulturen anzuziehen, wurden Teile der Matte auf 1%ige Agaroseplatten mit  $\frac{1}{2}$  PES-Medium ausgelegt und über Nacht beziehungsweise bis zu zwei Tage stehengelassen. Während dieser Zeit bewegten sich die einzelnen Filamente durch aktives Gleiten auf dem Medium aus den Mattensedimenten heraus. Individuelle Filamente konnten anschließend mit einer sterilen Nadel und mit Hilfe eines Binokulars (10-fache Vergrößerung) von der Platte in 20 ml Reagenzgläser mit 8 ml  $\frac{1}{2}$  PES-Flüssigmedium überführt werden.

Die Röhrchen wurden bei Raumtemperatur und permanenter Lichtzufuhr inkubiert. Nach 12 bis 20 Wochen wurden Proben aus den Röhrchen, in denen Kulturen herangewachsen waren, entnommen und mikroskopisch analysiert. Wenn die morphologischen Kriterien denen von *Microcoleus chthonoplastes* entsprachen (Garcia-Pichel et al., 1996; Staley et al., 1989) wurde ein Teil jeder identifizierten Kultur für weitere Untersuchungen aufbereitet (3.6.1).

Das Flüssigmedium in den Kulturröhrchen wurde alle vier Wochen komplett ausgetauscht, damit die Kulturen optimal versorgt waren.

Zusätzlich zu den selbst angezogenen Kulturen wurden schon vorhandene Kulturen verwendet. Eine Liste aller verwendeten Kulturen ist in Tabelle 1 dargestellt

**Tabelle 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten *M. chthonoplastes*-Kulturen einschließlich Herkunftsort**

	Herkunftsort	Gesammelt von*
MC-PCC 7420	Woods Hole, Massachusetts, USA (Atlantikküste)	J. Waterbury
MC-SAG	St. Peter Ording, Deutschland (Nordseeküste)	U. Karsten
MC-STO	St. Peter Ording, Deutschland (Nordseeküste)	AG U. Karsten
MC-NDN	Norderney, Deutschland (Nordseeküste)	F. Garcia-Pichel
MC-NEY-P2-17	Norderney, Deutschland (Nordseeküste)	J. Meemken
MC-NEY-P2-19	Norderney, Deutschland (Nordseeküste)	J. Meemken
MC-NEY-P2-20	Norderney, Deutschland (Nordseeküste)	J. Meemken
MC-K1-NEY1	Norderney, Deutschland (Nordseeküste)	
MC-K2-NEY1	Norderney, Deutschland (Nordseeküste)	
MC-K3-NEY3	Norderney, Deutschland (Nordseeküste)	
MC-K4-NEY4	Norderney, Deutschland (Nordseeküste)	
MC-K5-NEY4	Norderney, Deutschland (Nordseeküste)	
MC-K6-NEY5	Norderney, Deutschland (Nordseeküste)	
MC-K7-NEY5	Norderney, Deutschland (Nordseeküste)	
MC-K8-FWS	Fedderwardsiel, Deutschland (Nordseeküste)	
MC-K27-FWS	Fedderwardsiel, Deutschland (Nordseeküste)	
MC-K29-FWS	Fedderwardsiel, Deutschland (Nordseeküste)	

\* wenn kein Name angegeben wurde, wurden die Proben im Rahmen dieser Arbeit gesammelt

**Tabelle 1: Fortsetzung**

	Herkunftsort	Gesammelt von*
MC-MEL	Mellum, Deutschland (Nordseeküste)	AG U. Karsten
MC-WIS	Wismar, Deutschland (Ostseeküste)	AG U. Karsten
MC-WW5	Windwatt Bock, Deutschland (Ostseeküste)	AG U. Karsten
MC-EDA	Dänische Wiek, Deutschland (Ostseeküste)	AG U. Karsten
MC-SAH	Salzhaff, Deutschland (Ostseeküste)	AG U. Karsten
MC-LWP	Langenwerder, Deutschland (Ostseeküste)	AG U. Karsten
MC-LZW	Lietzow, Deutschland (Ostseeküste)	AG U. Karsten
MC-LF12	Limfjord, Dänemark (Nordseeküste)	U. Nübel
MC-LF13	Limfjord, Dänemark (Nordseeküste)	U. Nübel
MC-MAF	Mariager Fjord, Dänemark (Ostseeküste)	AG U. Karsten
MC-K9-VAR	Naturreservat Gamla Varberg, Schweden (Ostseeküste)	
MC-K10-VAR	Naturreservat Gamla Varberg, Schweden (Ostseeküste)	
MC-K11-VAR	Naturreservat Gamla Varberg, Schweden (Ostseeküste)	
MC-K25-VAR	Naturreservat Gamla Varberg, Schweden (Ostseeküste)	
MC-K26-VAR	Naturreservat Gamla Varberg, Schweden (Ostseeküste)	
MC-K28-VAR	Naturreservat Gamla Varberg, Schweden (Ostseeküste)	
MC-ASK5	Askoe, Schweden (Ostseeküste)	AG U. Karsten

\* wenn kein Name angegeben wurde, wurden die Proben im Rahmen dieser Arbeit gesammelt



Tabelle 1: Fortsetzung

	Herkunftsort	Gesammelt von*
MC-ED-2	Ebro-Delta, Spanien (Mittelmeerküste)	U. Nübel
MC-ED-3	Ebro-Delta, Spanien (Mittelmeerküste)	U. Nübel
MC-ED-4	Ebro-Delta, Spanien (Mittelmeerküste)	U. Nübel
MC-ED-10	Ebro-Delta, Spanien (Mittelmeerküste)	U. Nübel
MC-CAM	Rhone-Delta, Camargue, Frankreich (Mittelmeerküste)	A. Wieland
MC-LISS-2	Tejo-Mündung, Lissabon, Portugal (Atlantikküste)	I. Kramer
MC-K31-GN	Guerrero Negro, Baja California, Mexiko (Pazifikküste)	
MC-SC-1a-7	Guerrero Negro, Baja California, Mexiko (Pazifikküste)	U. Nübel
MC-SC-1a-9	Guerrero Negro, Baja California, Mexiko (Pazifikküste)	U. Nübel
MC-SC-5a-2	Guerrero Negro, Baja California, Mexiko (Pazifikküste)	U. Nübel
MC-SC-5a-3	Guerrero Negro, Baja California, Mexiko (Pazifikküste)	U. Nübel
MC-SC-5a-5	Guerrero Negro, Baja California, Mexiko (Pazifikküste)	U. Nübel
MC-SC-5a-6	Guerrero Negro, Baja California, Mexiko (Pazifikküste)	U. Nübel
MC-SC-100-1	Guerrero Negro, Baja California, Mexiko (Pazifikküste)	U. Nübel
MC-K24-SDB	San Diego Bay, Kalifornien, USA (Pazifikküste)	
MC-K32-SDB	San Diego Bay, Kalifornien, USA (Pazifikküste)	
MC-NCR	North Carolina, USA (Atlantikküste)	F. Garcia-Pichel
MC-TOW	Towra Point, Sydney, Australien (Pazifikküste)	F. Garcia-Pichel

\* wenn kein Name angegeben wurde, wurden die Proben im Rahmen dieser Arbeit gesammelt

## 2.5 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) genannt, wurde 1985 zum ersten Mal beschrieben und von Kary B. Mullis entwickelt, der 1993 dafür mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet wurde (Kück, 2005). Die PCR ist eine einfache und schnelle in-vitro-Methode, um Nukleinsäuren zu amplifizieren. Mittels thermostabiler DNA-Polymerasen, wie der aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnenen Taq-Polymerase, und zwei Oligonukleotidprimern mit bekannter Sequenzabfolge können DNA-Teilabschnitte in kürzester Zeit vervielfältigt werden. Die PCR läuft in mehreren Zyklen (meist 20 – 40) mit folgenden Schritten ab:

1. Denaturierung: Doppelsträngige DNA wird bei Temperaturen von 92° bis 95°C zu einsträngiger DNA denaturiert.
2. Annealing: Anlagerung der beiden Oligonukleotidprimer an komplementäre Sequenzen der Template-DNA durch Abkühlung des PCR-Mix auf eine von der Schmelztemperatur der Primer abhängige Temperatur.
3. Polymeration: Die Polymerase erzeugt ausgehend vom freien 3'-OH-Ende der Primer einen komplementären DNA-Strang durch Anlagerung von Desoxynukleotiden (dNTPs), die dem Reaktionsansatz in ausreichender Menge zugegeben werden.

Die neu entstandenen DNA-Stränge dienen im nächsten Zyklus ebenfalls als Template für die Primer, so dass sich mit jedem Zyklus die Anzahl der DNA-Fragmente verdoppelt. Durch diese exponentielle Vermehrungsrate kann die DNA in kurzer Zeit um die Größenordnung von  $10^6$  bis  $10^9$  vervielfältigt werden.

(Kück, 2005; Madigan et al., 2003)

### 2.5.1 Ernten der Zellen und Aufbereitung

Für die PCR wurden, neben den Kulturen, vorwiegend Filamente in einem kultivierungsunabhängigen Ansatz verwendet. Um die Filamente direkt zu amplifizieren, wurden zunächst Teile der Matte mit Hilfe eines Skalpells auf einer Platte mit festem  $\frac{1}{2}$  PES-Medium (1% Agarose) ausgestrichen und verteilt. Mit Hilfe eines Binokulars mit 10-facher Vergrößerung und einer sterilen Nadel wurden einzelne Filamente oder Filamentbündel, die von einer gemeinsamen Hülle umgeben waren, von der Platte gesammelt und jeweils in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße

gegeben, in denen sich je 10 µl TE-Puffer befand. Die Lösung in den Reaktionsgefäßen wurde anschließend in einem Heizblock für 3 Minuten auf 94°C erhitzt, um die Filamente zu lysieren. Das Lysat wurde dann direkt für die PCR verwendet, ohne einen zusätzlichen Schritt der DNA-Isolierung.

Für die PCR-Amplifizierung der Kulturen wurde mit einer sterilen Glaspipette Zellmaterial aus den Reagenzgläsern mit Flüssigmedium, in denen die Kulturen wachsen, herausgenommen und in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Das Material wurde für 1 Minute herunterzentrifugiert (13 000 U/min) und das überschüssige Medium abpipettiert. Anschließend wurde das Zellmaterial zweimal mit 100 µl TE-Puffer gewaschen und danach in 50 µl TE-Puffer gelöst. Ein zusätzlicher Schritt der DNA-Isolierung war auch hier für die PCR-Amplifizierung nicht nötig.

### 2.5.2 PCR-Primer Entwicklung

Um sicherzugehen, dass es sich bei den für die PCR verwendeten Filamenten um *Microcoleus chthonoplastes* handelt, wurden *M. chthonoplastes*-spezifische Primer entwickelt, die sich in der rDNA-ITS Region befinden (siehe auch 4.1). Der Vorwärts-Primer beginnt im 16S rRNA Gen an der E. coli-Position 731 und der Rückwärts-Primer in der ITS-Region an der E. coli-Position 1728. Erst nachdem die Filamente mit diesen Primern amplifiziert und als *M. chthonoplastes* identifiziert wurden, wurden die Gene *kaiC* und *petB/D* mit Cyanobakterien-spezifischen Primern amplifiziert. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der PCR wurden innerhalb dieser Arbeit zusätzlich noch für *M. chthonoplastes* besser geeignete Primer sowohl für *kaiC* als auch *petB/D* entwickelt und verwendet.

Eine Auflistung der Primer einschließlich ihrer Sequenzen ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Primer für die PCR-Amplifikation und Sequenzierung**

Primer	Sequenz (5'-3')	Locus	Referenz
Mic731F	GCG CTC TAC TGG ACG G	16S rDNA	Lodders et al., 2005
Mic1728R	AGT ATG GAG GTA AGC GGA C	ITS	Lodders et al., 2005
MicITSR	CTG ATT KTT TCA CCK GGT CT	ITS	unveröffentlicht
<i>kaiC</i> 488F	ACI ATG ATI GAR GGI TTI GAY GAI AT	<i>kaiC</i>	Lorne et al., 2000
<i>kaiC</i> 489R	GTR AAI GGR TAY TCI GGY TTC ATR TG	<i>kaiC</i>	Lorne et al., 2000
MC <i>kaiC</i> 1F	GCC ATG GKG GGT TAC CYG TG	<i>kaiC</i>	unveröffentlicht
MC <i>kaiC</i> 1R	GTT GTA CCC CGT ARC TTR AG	<i>kaiC</i>	unveröffentlicht
<i>petF</i>	ATG ATG GTI YTI ATG ATG AT	<i>petB</i>	Urbach et al., 1998
<i>petR</i>	CCR TAR TAR TTR TGI CCC AT	<i>pet</i> -IGS	Urbach et al., 1998
MC <i>pet</i> 1F	TGC TGA TGA TGA TTT TGC AC	<i>petB</i>	unveröffentlicht
MC <i>pet</i> 1R	GTA GTT GTG GCC CAT GCC T	<i>pet</i> -IGS	unveröffentlicht
1100F <sup>a</sup>	GCA ACG AGC GCA ACC C	16S rDNA	Lane, 1991
1334F <sup>a</sup>	TGT ACA CAC CGC CCG TC	16S rDNA	Lodders et al., 2005
1500R <sup>a</sup>	AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC	16S rDNA	Rainey et al., 1996

<sup>a</sup> nur für die Sequenzierung verwendete Primer

### 2.5.3 PCR-Amplifikation

Für die PCR wurden je 1 µl der in TE-Puffer lysierten Filamente beziehungsweise der Kulturen als Ausgangsmaterial verwendet. Die Zusammensetzung des PCR-Mix mit einem Gesamtvolumen von 50 µl sowie die PCR-Bedingungen sind im Folgenden aufgelistet.

#### PCR-Mix (50 µl Ansatz)

Lysat	1,00 µl
Primer (50 µM; Auflistung siehe Tabelle 2)	1,00 µl
10x Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	5,00 µl
dNTPs	
(je 200 µM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	10,00 µl
Taq DNA-Polymerase (1,25 U/µl)	0,25 µl
ReinstH <sub>2</sub> O	32,75 µl

## PCR-Bedingungen

### 16S rRNA-ITS

94°C 2 min  
94°C 45 sek }  
46°C 45 sek } 41 Zyklen  
72°C 1 min }  
72°C 7 min

### *kaiC*

Primer *kaiC488F* und *kaiC489R*

94°C 2 min  
94°C 45 sek }  
40°C 45 sek } 38 Zyklen  
72°C 1 min }  
72°C 7 min

Primer *MCkaiC1F* und *MCkaiC1R*

94°C 2 min  
94°C 45 sek }  
60°C 45 sek } 38 Zyklen  
72°C 1 min }  
72°C 7 min

### *petB/D*

Primer *petF* und *petR*

94°C 3 min  
94°C 1 min }  
50°C 1 min } 35 Zyklen  
72°C 1 min }  
72°C 10 min

Primer *MCpet1F* und *MCpet1R*

94°C 3 min  
94°C 1 min }  
55°C 1 min } 3 5 Zyklen  
72°C 1 min }  
72°C 10 min

## 2.5.4 Gel-Elektrophorese

Bei der hier verwendeten Art der Gel-Elektrophorese wird die DNA in einem mit Agarose als Matrix dienendem Gel durch Anlegung elektrischer Spannung aufgetrennt. Die negativ geladene DNA wandert zum Plus-Pol (Anode) der Spannungsquelle, wobei kleinere DNA-Fragmente schneller wandern als größere. Durch den im Gel enthaltenen Farbstoff Ethidiumbromid wird die DNA als fluoreszierende Bande unter UV-Licht sichtbar. Da in dieser Arbeit PCR-Produkte mit

ungeschnittener DNA verwendet wurden, sollte im Normalfall jeweils nur eine Bande sichtbar sein.

Je 5 µl PCR-Produkt wurden mit je 3 µl Ladepuffer auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und für 40 Minuten bei 130 Volt laufen gelassen. Als Größen- und Mengenvergleich wurden standardisierte Marker (Marker III und VIII) verwendet. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht fotografiert.

### **2.5.5 Aufreinigung der PCR-Produkte**

PCR-Produkte, die Banden in der richtigen Größe enthielten, wurden anschließend aufgereinigt, um sequenziert werden zu können. Bei der Aufreinigung wird die DNA von Zell- und Lösungsrückständen gereinigt und anschließend zur weiteren Analyse in bidestilliertem Wasser gelöst. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des kommerziellen QIAquick-Systems: Es wurden jeweils 250 µl Bindungspuffer auf 50 µl PCR-Produkt gegeben und die Lösung durch vortexen gemischt. Anschließend wurde die Lösung in die QIAquick-Säulen pipettiert und für 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert; die DNA bleibt dabei in den Säulen. Der Überschuss wurde verworfen und 740 µl Waschpuffer wurde auf die Säulen gegeben. Nachdem die Säulen für 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert wurden, wurde der Überschuss verworfen und die Säulen nochmals für 3 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Die Säulen wurden anschließend in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Um die DNA zu lösen, wurden 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf die Säulen gegeben und diese dann 1 Minute stehen gelassen. Anschließend wurden die Säulen 3 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Die DNA war nun in den 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und konnte zur Sequenzierung verwendet werden.

## **2.6 Sequenzierung**

Bei der Sequenzierung wird die Nukleotidabfolge eines Gens oder DNA-Fragments bestimmt. Die heute am weitesten verbreitete Form der Sequenzierung erfolgt nach der Sanger-Methode. Die Methode wurde von Sanger et al. in den 70er Jahren entwickelt. Von einem für die zu sequenzierende DNA spezifischen Primer ausgehend, wird mit Hilfe von Taq-Polymerasen ein neuer DNA-Strang gebildet. Während der Synthese lagert sich an einem zufälligen Zeitpunkt ein Didesoxynukleotid (ddNTP) an und die DNA-Synthese wird damit beendet. Durch die

Wiederholung dieser Prozedur während der Amplifikation werden Fragmente mit unterschiedlicher Länge gebildet. Ursprünglich wurden die Fragmente bei der Synthese radioaktiv markiert und die Nukleotidabfolge nach dem Auftragen auf ein Polyacrylamidgeld mittels Autoradiographie bestimmt. Schon ein Längenunterschied von einem Nukleotid resultiert bei dieser Methode auf dem Gel in räumlich unterschiedlich angeordneten Banden.

Die Sequenzierung erfolgt heutzutage mit automatischen Sequenzierern, die eine hohe Durchlaufkapazität haben. Anstatt radioaktiver Marker werden Fluoreszenzmarker mit vier verschiedenen Farbstoffen für die vier Nukleinsäuren verwendet.

Die Sequenzabfolge wird automatisch vom Computer analysiert und als Chromatogramm sowie als Nukleinsäureabfolge ausgegeben (Madigan et al., 2003; Middendorf et al., 2001).

### **2.6.1 Cycle Sequencing, Aufbereitung der Proben und Sequenzierung**

Beim Cycle Sequencing werden aus dem PCR-Produkt fluoreszenzmarkierte Fragmente unterschiedlicher Länge synthetisiert, die durch Ethanolfällung aufgereinigt werden und anschließend sequenziert werden können.

Für die Sequenzierung der rDNA-ITS Region wurden für das Cycle Sequencing die Primer 1334F (beginnt an E.coli Position 1334 im 16S rRNA Gen) und 1500R (beginnt an E.coli Position 1521 im 16S rRNA Gen) in der Konzentration von 0.025 µg/µl bzw. 5µM verwendet. Teilweise wurde der Primer 1100F gebraucht (Tabelle 2). Einige wenige PCR-Produkte wurden mit den PCR-Primern 731F und 1728R in 1:10-facher Verdünnung (=5 µM) sequenziert.

Für die Gene *kaiC* und *petB/D* wurden die PCR-Primer mit einer Verdünnung von 1:10 (= 5 µM) verwendet.

### **Cycle Sequencing**

Das Cycle Sequencing erfolgte mit einem kommerziellen Kit von Beckman. In dem Sequenziermix dieses Kits sind die Taq-Polymerase sowie die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide schon zugegeben.

**Cycle Sequencing Mix (10 µl Ansatz in 0.2 µl Reaktionsgefäßen)**

PCR Produkt	2 – 3 µl (2µl für die Primer 1100F, 1334F, 1500R)
Primer (5 µM)	1 µl
Beckman Termination Mix	3 µl
ReinstH <sub>2</sub> O	3 – 4 µl

**PCR-Bedingungen Cycle Sequencing**

96°C 20 sek	} 30 Zyklen
50°C 20 sek	
60°C 4 min	

**Ethanol-Fällung**

Jeweils 1 µl Glycogen, 2 µl 0.1 mol EDTA, 2 µl Natriumacetat und 10 µl H<sub>2</sub>O wurden zusammen mit dem Cycle Sequencing Produkt in ein 0.2 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und anschließend 60 µl 95% Ethanol hinzugegeben. Das Ganze wurde durch vortexen gemischt und für 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert; die DNA fällt dabei als Pellet aus. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und 200 µl 70% Ethanol zu dem Pellet in das Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Die letzten beiden Schritte wurden wiederholt. Danach wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet für 4 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Nach der Trocknung wurden 30 µl SLS (Beckman) zugegeben, die Lösung gemischt und kurz runterzentrifugiert.

**Sequenzierung**

Für die Sequenzierung wurde ein Kapillarsequenzierer von Beckman mit acht Kapillaren verwendet (CEQ 8000).

**2.7 Auswertung****2.7.1 Bearbeitung der Sequenzen und Alignment**

Die Daten, die nach dem Sequenzieren als Rohdaten vorliegen, wurden mit dem CEQ<sup>TM</sup> 8000 Genetic Analysis System analysiert und auf die richtige Länge zurechtgeschnitten. Die auf diese Weise erhaltenen Chromatogramme einschließlich



der Nukleinsäuresequenzen wurden exportiert und mit dem Analyseprogramm BioNumerics (Applied Maths, Belgien) weiterverarbeitet.

### **Multiples Alignment**

Beim multiplen Alignment handelt es sich um das Anordnen und gleichzeitige Analysieren mehrerer Sequenzen.

Die bearbeiteten Sequenzen wurden miteinander verknüpft, indem das Programm nach der größtmöglichen Übereinstimmung suchte und die Sequenzen mit möglichst wenigen Lücken untereinander ausgab. Auf diese Weise konnten die Sequenzen miteinander verglichen werden, um unter anderem den Grad der Verwandtschaft zueinander zu ermitteln.

Das Alignment erfolgte in BioNumerics mit den dort voreingestellten Parametern (Open gap penalty 100%, unit gap penalty 0%, minimum match sequence 2, maximum number of gaps 98, use fast algorithm). Es wurde anschließend manuell kontrolliert und gegebenenfalls nachgebessert.

Für das Erstellen phylogenetischer Bäume wurden die untereinander ausgerichteten Sequenzen am Anfang und am Ende alle auf die gleiche Länge abgeschnitten.

### **2.7.2 Phylogenetische Bäume**

Durch das Erstellen phylogenetischer Bäume wird versucht, die evolutionären Beziehungen zwischen Organismen aufzuzeigen (Hansen, 2001). Die Lage der Organismen zueinander sowie die Astlänge der phylogenetischen Bäume zwischen den Organismen sind Indikatoren ihrer Verwandtschaftsbeziehungen. Es gibt verschiedene Methoden zur Berechnung phylogenetischer Bäume. Dazu gehören vor allem Distanzmethoden (z. B. Neighbor-Joining; UPGMA), Parsimonymethoden (Maximum Parsimony) und Maximum-Likelihood-Methoden.

#### **Distanzmethoden**

Bei den Distanzmethoden werden evolutionäre Distanzen durch den schrittweisen Vergleich der Sequenzen berechnet und eine Distanzmatrix erstellt, mit deren Hilfe anschließend der Baum berechnet wird.

Eine häufige Baumerstellungsmethode ist die von Saitou und Nei (1987) entwickelte Neighbor-Joining-Methode. Bei dieser Methode wird zuerst eine sternenförmige Topologie angelegt und von dieser ausgehend durch Vergleich der Ähnlichkeit der

Sequenzen der Baum erstellt. Das Ziel dabei ist es, die totale Astlänge des Baumes durch die Zuordnung von Nachbarn auf die kleinstmögliche Länge zu reduzieren und diesen Baum dann als den am wahrscheinlichsten vorkommenden Baum zu betrachten (Graur und Li, 2000).

### **Parsimonymethoden**

Bei der Parsimonymethode wird der Baum erzeugt, der mit der kleinsten Anzahl evolutionärer Unterschiede (zum Beispiel Nukleotidsubstitutionen) auskommt. Es wird eine größere Anzahl Bäume berechnet und der Baum, der die kleinste Anzahl an Unterschieden aufweist, also der kürzeste mögliche Baum, wird als „maximum parsimony tree“ ausgewählt. Es kann auch vorkommen, dass zwei oder mehrere Bäume den gleichen Wert aufweisen. Man bezeichnet diese Bäume dann als „equally parsimonious“, also gleichwertig.

Bei dieser Methode wird zwischen informativen und nicht-informativen Polymorphismen unterschieden. Als informativ wird eine variable Position im Alignment verstanden, bei der jedes vorhandene Nukleotid an dieser Stelle mindestens in zwei Sequenzen vorkommt. Die Methode ist in der Berechnung wesentlich zeitaufwändiger als die Neighbor-Joining-Methode (Hansen, 2001; Graur und Wen-Hsiung, 2000).

### **Maximum-Likelihood-Methoden**

Bei Maximum-Likelihood-Methoden wird versucht, den Baum zu finden, der am wahrscheinlichsten die Verwandtschaftsbeziehungen der untersuchten Daten (zum Beispiel Nukleotidsequenzen) wiedergibt. Die Wahrscheinlichkeit (Likelihood) des Baumes ergibt sich dabei aus der Berechnung der Einzelwahrscheinlichkeiten für jede einzelne Position im Alignment, aus denen dann der Logarithmus gebildet wird. Das Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten wird dadurch zur Summe der Einzelwahrscheinlichkeiten transformiert. Maximum-Likelihood Berechnungen sind extrem zeitaufwändig und eignen sich daher nicht für sehr große Datensätze (Hansen, 2001; Graur und Wen-Hsiung, 2000).

### **Bootstrapping**

Beim Bootstrapping wird beliebig oft ein neues multiples Alignment erzeugt (zum Beispiel bei einem Bootstrap-Wert von 1000 wird der Datensatz 1000-mal neu

kombiniert) und der Baum jedes Mal neu berechnet. So wird die Reihenfolge der Sequenzen im Alignment verändert oder aber die Positionen der Nukleotide innerhalb des Alignments für alle Sequenzen gleichzeitig verändert. Je öfter der gleiche Baum dabei gebildet wird, desto höher ist die statistische Signifikanz des Baumes (Hansen, 2001).

Die phylogenetischen Bäume dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Nukleinsäuresequenzen erstellt. Die hauptsächlich verwendete Methode war die Neighbor-Joining-Methode; es wurden aber auch maximum parsimony- und Maximum-Likelihood Bäume erstellt. Aufgrund der großen Datensätze wurden die Bäume mit Bootstrap-Werten von jeweils 100 berechnet, da die Rechnerleistung für höhere Bootstrap-Werte bei einer großen Anzahl von Sequenzen nicht ausreichte. Nur bei der Berechnung von Bäumen mit weniger als 50 Sequenzen wurde ein Bootstrap-Wert von 1000 angegeben.

### **2.7.3 Splittrees**

Phylogenetische Analysen, wie sie im Kapitel zuvor besprochen wurden, legen sich auf einen bestimmten Baum fest. Je nach Berechnungsmethode ist das zum Beispiel der kürzeste mögliche Baum oder der am wahrscheinlichsten vorkommende Baum. Der Baum ist dabei ein theoretisches Konstrukt mit einer mehr oder weniger ausgeprägten statistischen Signifikanz, wie in den Bootstrap-Werten angezeigt wird. Oftmals kommt es jedoch vor, dass die vorhandenen Daten keine eindeutige phylogenetische Zuordnung erlauben. Der berechnete Baum zeigt niedrige Bootstrap-Werte und eine eher geringe Wahrscheinlichkeit an. Wenn die Daten nicht eindeutig zuzuweisen sind, ist es sinnvoller, sie statt durch einen phylogenetischen Baum durch ein Netzwerk darzustellen.

Zu diesem Zweck entwickelten Bandelt und Dress (1992) die split decomposition Methode. Bei dieser Methode wird nicht zwingend davon ausgegangen, dass ein einzelner Baum erstellt werden muss. Wenn die Daten widersprüchlich sind und nicht eindeutig den Ästen eines Baumes zugeordnet werden können, wird stattdessen ein baumähnliches Netzwerk dargestellt. Netzwerke statt Bäume werden zum Beispiel berechnet, wenn innerhalb eines Gens Rekombination auftritt und die Ähnlichkeit der Sequenzen nicht mehr nur eine Funktion des vertikalen Gentransfers von einer Generation zur nächsten (einschließlich auftretender Mutationen) ist.

Die split decomposition Analyse wurde mit Hilfe des Internet-Programms SplitsTree 3.2 berechnet. Das Programm findet sich auf der Web-Seite <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/splits/> und wurde von Huson (1998) entwickelt. Für die Analysen wurden in BioNumerics Distanzmatrizen der Sequenzen erstellt und diese in SplitsTree 3.2 eingegeben. Das Programm berechnete daraus anschließend den dazugehörigen Splitstree.

Alternativ dazu wurden Splitstrees mit dem Programm SplitsTree 4 Beta von Huson & Bryant (2006) erstellt, das unabhängig vom Internet läuft. Das Programm ist unter [www.splitstree.org](http://www.splitstree.org) zu finden. In dieser Version wurden statt Distanzmatrizen die Sequenzen im Nexus-Format eingelesen. Die Sequenzen wurden dazu als Fasta-Format aus BioNumerics exportiert und mit dem Programm START (= Sequence Type Analysis and Recombinational Tests, Jolley et al., 2001) in Nexus-Format umgewandelt.

Die daraus resultierenden Splitstrees unterschieden sich nicht signifikant von den mit Hilfe der Distanzmatrizen erstellten Splitstrees.

#### **2.7.4 Multilocus Sequenzanalyse**

Bei der Multilocus Sequenzanalyse (MLSA) werden mit Hilfe der Sequenzen für jede Probe Allelprofile erstellt. Unterschiedliche Sequenzen eines Gens werden als Allele dieses Gens bezeichnet und erhalten unterschiedliche Allelnummern. Es spielt dabei keine Rolle, in wie vielen Nukleotiden sich die Sequenzen voneinander unterscheiden. Die Allelnummern der verschiedenen Genloci eines einzelnen Individuums ergeben dessen Allelprofil, dem jeweils ein Sequenztyp (ST) zugeordnet wird. Unterschiedliche Sequenztypen erhalten unterschiedliche Nummern. Nah verwandte Isolate haben nahezu identische Allelprofile die sich nur an wenigen Loci unterscheiden; nicht verwandte Isolate haben nicht verwandte Allelprofile (Urwin und Maiden, 2003; Enright und Spratt, 1999). Die Allelprofile können anschließend genutzt werden, um phylogenetische Bäume zu erstellen oder populationsgenetische Analysen durchzuführen, wie zum Beispiel die Berechnung des Assoziationsindex (s. nächster Punkt).

Die Auflösung dieser Methode ist abhängig von der Nummer und Art der Gene, der Länge der Sequenzen und dem Grad der Diversität in der untersuchten Art (Cooper und Feil, 2004).

In dieser Arbeit wurden Allelprofile für die drei Genloci rDNA-ITS, *kaiC* und *petB/D* erstellt. Jedes Filament bzw. jede Kultur erhielt eine Sequenztypnummer ausgehend von den Allelnummern der drei Gene (vgl. Tabelle 5 und Tabelle 7.1 im Anhang).

Die Erstellung der Grafiken zu den Zusammenhängen zwischen Anzahl der untersuchten Sequenzen und der Anzahl der Allele am Beispiel *kaiC* beziehungsweise der Anzahl der Sequenztypen erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft).

### 2.7.5 Koppelungsgleichgewicht, Assoziationsindex

Koppelungsgleichgewicht oder linkage equilibrium bedeutet, dass die Häufigkeit und Anordnung von Allelen verschiedener Genloci einer Population statistisch unabhängig voneinander sind. Bei einer nicht zufälligen Anordnung der Allele befindet sich die Population in einem Koppelungsungleichgewicht (linkage disequilibrium). Ein Koppelungsgleichgewicht deutet auf freie Rekombination hin, während ein Ungleichgewicht auf eher seltene oder nicht vorhandene Rekombination hinweist (Koehler et al., 2003; Nordborg und Tavaré, 2002).

Als Maß für den Grad der Koppelung in Multilocus-Datensätzen kann der Assoziationsindex  $I_A$  (Index of Association) herangezogen werden. Der Assoziationsindex wird von Maynard Smith (1993, 1995) definiert als

$$I_A = V_{\text{obs}} / V_{\text{exp}} - 1$$

wobei  $V_{\text{obs}}$  die beobachtete Varianz der paarweise genetischen Distanzen für alle möglichen Kombinationen der Individuen ist und  $V_{\text{exp}}$  die erwartete Varianz, wenn sich die Population in einem Koppelungsgleichgewicht befindet und die Allele der verschiedenen Loci unabhängig voneinander sind.

$V_{\text{exp}}$  lässt sich berechnen durch die Formel

$$V_{\text{exp}} = \sum h_j (1-h_j)$$

$h_j$  ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Individuen am Locus  $j$  unterscheiden.

Ein Assoziationsindex von null wird erwartet, wenn keine Assoziation zwischen den Loci vorhanden ist und sich die Population in einem Koppelungsgleichgewicht befindet. Bei einem Assoziationsindex, der sich signifikant von null unterscheidet, befindet sich die Population in einem Koppelungsungleichgewicht und Rekombination ist vermutlich eher selten oder nicht vorhanden (Maynard Smith, 1995; Maynard Smith et al., 1993).

Koppelungsungleichgewicht kann aber auch in Populationen vorkommen, in denen Rekombination häufig ist. Dazu können zum Beispiel Populationen mit epidemischer Populationsstruktur gehören. Es kann daher nicht ohne weiteres von einem hohen Assoziationsindex auf eine klonale Populationsstruktur geschlossen werden.

Um den Assoziationsindex zu berechnen, wurde das im Internet verfügbare Programm LINKAGE DISEQUILIBRIUM verwendet, das sich auf der Webseite des MLST-Projektes befindet (<http://www.mlst.net>). Das Koppelungsungleichgewicht wurde als signifikant betrachtet, wenn  $V_{\text{obs}}$  größer war als die maximale Varianz, die bei 1000 Wiederholungen mit zufälliger Anordnung des Datensatzes berechnet wurde ( $P < 0.001$ ).

#### **2.7.6 Incongruence length difference test (ILD-Test)**

Der incongruence length difference test, oder kurz ILD-Test, vergleicht zwei oder mehrere Datensätze, zum Beispiel Nukleotidsequenzen unterschiedlicher Genloci, in Bezug auf ihre Kongruenz zueinander. Nicht-kongruente Datensätze deuten auf unterschiedliche Entwicklungsgeschichten der zugrundeliegenden Gene hin, wie sie unter anderem durch Rekombination auftreten können. Widersprüchliche Phylogenien zwischen Datensätzen können aber auch zufällig entstehen. In solchen Fällen würde das Kombinieren der Datensätze zu einer verbesserten Aussage über die Verwandtschaftsgrade von Organismen führen. Der ILD-Test untersucht, ob die Datensätze signifikant voneinander verschieden sind oder ob Unterschiede in den Phylogenien rein zufällig sind. Die Datensätze werden zuerst einzeln analysiert. Anschließend werden Berechnungen für eine vorher festgelegte Anzahl zufällig erzeugter Partitionen der Datensätze durchgeführt. Diese Partitionen haben die gleiche Größe der ursprünglichen Datensätze, bestehen aber aus zufällig angeordneten Segmenten beider Datensätze (Cunningham, 1997). Die Nullhypothese (die Bäume sind kongruent) wird abgelehnt, wenn die summierte

Länge der aus einzelnen Segmenten kombinierten Bäume signifikant größer ist als die Länge der Originalbäume (bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0.05$ ) (Brown et al., 2002).

In dieser Arbeit wurden Datensätze für die Genloci rDNA-ITS – *kaiC*, rDNA-ITS – *petB/D* und *kaiC* – *petB/D* miteinander kombiniert. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm PAUP 4.0 beta 10. Es wurden 100 Wiederholungen und eine heuristische Suche gewählt.

## 2.8 Hinterlegung der Sequenzen in der EMBL-Datenbank

Ein Teil der Sequenzen wurde aufgrund der Vorveröffentlichung eines Teils der Ergebnisse dieser Arbeit in der Datenbank von EMBL hinterlegt. Die Sequenzen sind unter den Nummern AJ809630 bis AJ809872 zu finden. Es handelt sich hierbei um Sequenzen von Proben aus der Nordsee- und Ostseeregion.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Primer-Entwicklung für die kulturunabhängige Sequenzierung

Zur eindeutigen Identifizierung der untersuchten Filamente als *Microcoleus chthonoplastes* wurde ein *M. chthonoplastes* spezifisches Primerpaar entwickelt, das für die Amplifizierung der rDNA-ITS Region verwendet wurde. Schon vorhandene Sequenzen des rRNA Operons (Vollsequenzen des 16S rRNA Gens, des daran anschließenden Spacers und eines Teilbereichs des 23S rRNA Gens) dienten als Ausgangsbasis für die Entwicklung der Primer. Die in einem Alignment angeordneten Sequenzen der Kulturen wurden auf Gemeinsamkeiten hin untersucht und mögliche Sequenzabschnitte in Sequenzdatenbanken mit den Sequenzen anderer Cyanobakterien sowie Mikroorganismen allgemein verglichen. Auf diese Weise wurden zwei Sequenzabschnitte, die nicht in anderen Mikroorganismen vorkamen, als Primerpaar ausgewählt (Primer Mic731F und Mic1728R). Alle bis dahin vorhandenen *M. chthonoplastes*-Kulturen sowie als Negativkontrollen *Spirulina*-, *Lyngbya*- und *Chloroflexus*-Kulturen wurden anschließend mit den Primern Mic731F und Mic1728R PCR-amplifiziert. Die *M. chthonoplastes*-Kulturen zeigten deutliche Banden in der Höhe, die ungefähr 1000 Basenpaare entspricht, während die Negativkontrollen keine Banden, bzw. Banden in der falschen Höhe zeigten (Abbildung 3).

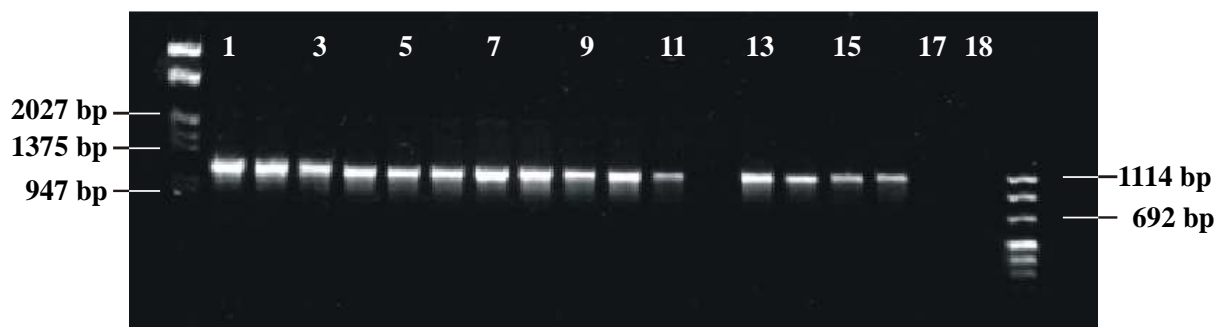


**Abbildung 3:** PCR-Produkte von *M. chthonoplastes*-Kulturen sowie *Spirulina*-, *Lyngbya*- und *Chloroflexus*-Kulturen nach der Amplifizierung mit dem Primerpaar Mic731F und Mic1728R. Spur 1 – 3: *M. chthonoplastes* (Spur 1: MC-SAG; Spur 2: MC-LF13; Spur 3: MC-ED-2); Spur 4: *Spirulina* PCC 6313; Spur 5: *Lyngbya* PCC 7419; Spur 6: *Chloroflexus auranticus* DSM 636; Spur 7: H<sub>2</sub>O.



Nach dem erfolgreichen Test der Primer mit Hilfe der Kulturen konnten die Primer anschließend mit *M. chthonoplastes* Filamenten getestet werden. Jeweils ein Filament beziehungsweise Filamentbündel wurde in 10 µl TE-Puffer lysiert und davon je 1 µl für die PCR genommen. Für erste Versuche wurden die Filamente von vorhandenen Kulturen genommen, nachdem das Material auf Nährmedium in Petrischalen ausgestrichen wurde. Es wurden der Stamm PCC 7420 sowie eine Kultur aus Norderney (MC-NDN) verwendet. Auch hier zeigten sich deutliche Banden, wie auch bei anschließenden Versuchen mit frisch gesammelten Mattenproben aus Norderney (Abbildung 4) sowie mit Proben aus eingefrorenem Mattenmaterial, das aus Baja California stammte. Die besten Ergebnisse wurden allerdings mit frischem Mattenmaterial erzielt.

Die Primer eigneten sich damit zuverlässig für die Amplifizierung und Identifizierung einzelner Filamente aus Proben natürlicher Populationen.



**Abbildung 4:** PCR-Produkte einzelner Filamente. Als Primerpaar wurden Mic731F und Mic1728R verwendet. Spur 1 – 16: Filamente von Norderney; Spur 17: H<sub>2</sub>O; Spur 18: *Lyngbya* PCC 7419.

### 3.2 Evaluierung der kulturunabhängigen Sequenzierung für die MLSA

Bei der Multilocus Sequenzanalyse (MLSA) werden mehrere Gene für ein und dasselbe Individuum sequenziert, um auf diese Weise aussagekräftige Ergebnisse in Bezug auf populationsgenetische Strukturen und Phylogenien zu erhalten. Für die Entwicklung des kulturunabhängigen Ansatzes war es entscheidend, dass ein Filament für die Amplifikation mehrerer Genloci verwendet werden konnte. Es war daher nicht möglich, das Filament direkt in den PCR-Ansatz zu transferieren.

Stattdessen wurde das Filament in 10 µl TE-Puffer eluiert und für 3 Minuten bei 94°C lysiert. Anschließend wurde für die PCR je 1 µl daraus entnommen.

Die auf diese Weise gewonnene Menge an amplifizierter DNA war ausreichend, um aussagekräftige Sequenzen zu erhalten. Es konnten auf diese Weise mehrere Genloci für ein Filament analysiert werden. Probleme ergaben sich teilweise nach längerer Lagerung des Filament-Puffer-Gemisches. Es konnte vorkommen, dass bei versuchter Amplifizierung nach längerer Zeit keine PCR-Banden sichtbar waren und die Amplifizierung damit fehlschlug. Dies traf besonders auf den *petB/D* Genlocus zu. Nach der Entwicklung von speziell für *M. chthonoplastes* geeigneten Primern für *kaiC* und *petB/D* wurde dieses Problem jedoch stark verringert, auch wenn es nicht vollständig gelöst werden konnte. Nochmaliges Erhitzen der Filamente vor der Amplifizierung oder eine Lagerung bei 4°C anstelle von –20°C zeigten keine Verbesserung des Amplifizierungserfolgs. Es wurde daher darauf geachtet, die Amplifizierung aller Genloci möglichst innerhalb von zwei Wochen abzuschließen. Auch mit zuvor eingefrorenem Mattenmaterial ließen sich direkt nach der Entnahme der Filamente aus der Probe gute Ergebnisse erzielen.

### **3.3 Biogeographie und Populationsgenetik**

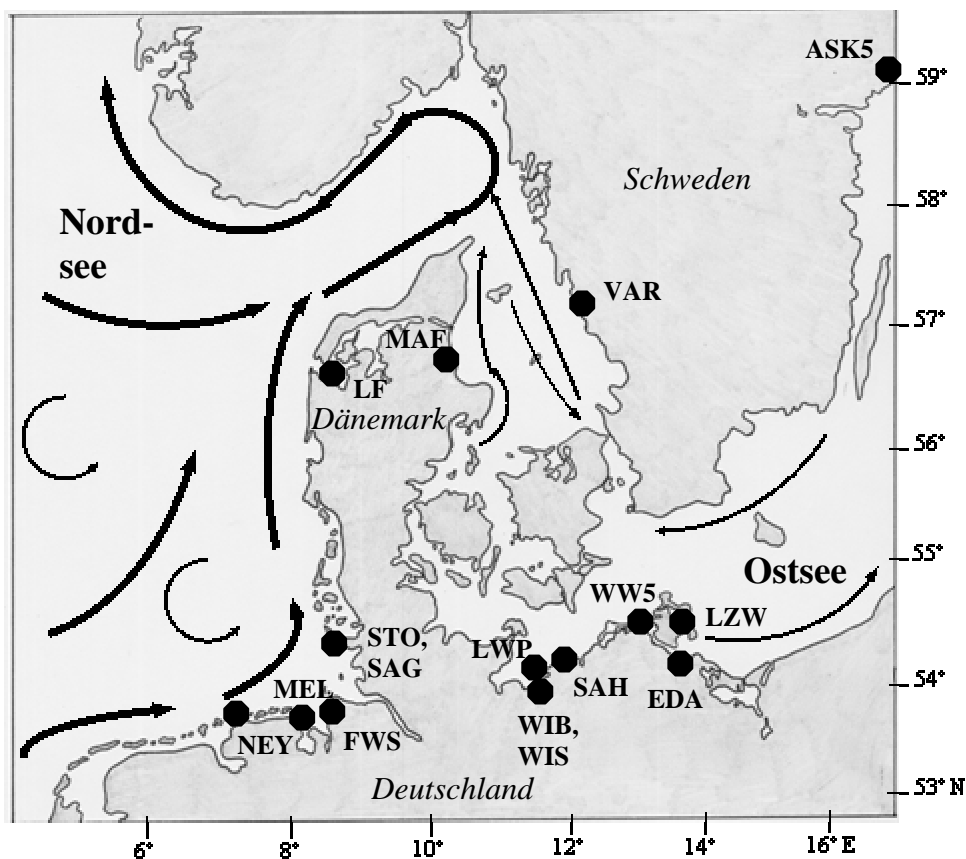
#### **3.3.1 Nordsee- und Ostseeregion**

##### **3.3.1.1 Diversität**

Es wurden insgesamt 153 Proben untersucht, davon 119 Filamente, die direkt für die Sequenzierung verwendet wurden, und 34 angezogene Kulturen. Die Proben stammten aus Deutschland, Dänemark und Schweden. Eine detaillierte Übersicht ist in Tabelle 3 zu sehen, sowie die Sammelstandorte einschließlich der dort vorherrschenden Meeresströmungen in Abbildung 5. Die Sequenzlängen variierten zwischen 548 Nukleotiden Länge (rDNA-ITS-Region, davon 341 Nukleotide im 16S rRNA Gen und 207 Nukleotide in der ITS-Region), 477 Nukleotiden Länge (*kaiC*) und 349 Nukleotiden Länge (*petB/D*, davon 296 Nukleotide in *petB* und 52 Nukleotide in der Spacer-Region *pet-IGS*).

**Tabelle 3: Bezeichnung, Herkunft und Anzahl der Filamente und Kulturen aus der Nordsee- und Ostseeregion**

	Fundort	Anzahl Filamente	Anzahl Kulturen
NEY	Norderney, Nordseeküste, D	21	11
FWS	Fedderwardersiel, Nordseeküste, D	14	3
MEL	Mellum, Nordseeküste, D	3	1
STO, SAG	St. Peter Ording, Nordseeküste, D	-	2
WIB, WIS	Wismarer Bucht, Ostseeküste, D	53	1
SAH	Salzhaff, Ostseeküste, D	-	1
WW5	Windwatt, Ostseeküste, D	-	1
LWP	Langenwerder, Ostseeküste, D	-	1
LZW	Lietzow, Ostseeküste, D	-	1
EDA	Dänische Wiek, Ostseeküste, D	-	1
MAF	Mariager Fjord, Ostseeküste, Dk	-	1
LF	Limfjord, Nordseeküste, Dk	-	2
VAR	Varberg, Ostseeküste, S	29	6
ASK5	Askoe, Ostseeküste, S	-	1



**Abbildung 5:** Karte der Probensammelstandorte einschließlich der dort vorherrschenden Meeresströmungen (eigene Zeichnung).

Es konnten je nach Genlocus 28 – 66 Polymorphismen in den Sequenzen gefunden werden (Tabelle 4). Der überwiegende Teil der Polymorphismen war informativ, das heißt, jedes Nukleotid kam an einer bestimmten Stelle der Sequenz in mindestens zwei der untersuchten Individuen vor. Es ist daher wenig wahrscheinlich, dass diese Polymorphismen auf Sequenzierfehler zurückzuführen sind. Die meisten der Mutationen in den proteinkodierenden Genen waren synonym und führten nicht zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz. Die genaue Anzahl informativer und synonymen Polymorphismen ist in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4: Länge der Sequenz, Anzahl der Allele, synonyme und informativer Polymorphismen für die einzelnen Genloci**

Locus	Länge der Sequenz	Allele	Anzahl variabler Positionen	Anzahl informativer Polymorphismen
rDNA-ITS	548	19	66	61
16S rDNA	341		15	13
ITS	207		51	48
<i>kaiC</i>	477	26	57 / 51 <sup>a</sup>	55 / 50 <sup>a</sup>
<i>petB/D</i>	348	9	28	26
<i>petB</i>	296		21 / 20 <sup>a</sup>	19 / 18 <sup>a</sup>
<i>pet</i> -IGS	52		7	7

<sup>a</sup> synonyme Positionen

Jede unterschiedliche Nukleotidsequenz eines Gens erhielt eine eigene Allelnummer, und der Kombination der Allele der unterschiedlichen Loci eines Individuums wurde ein Sequenztyp zugeordnet. Die Anzahl der Allele variierte zwischen 9 und 26 (Tabelle 4). Aus dem Allelprofil ergaben sich für die 153 untersuchten Individuen 56 unterschiedliche Sequenztypen (Tabelle 5). Für jeden Genlocus gab es zwei Allele, die gehäuft auftraten. In der rDNA-ITS gehörten 70% aller Sequenzen zwei Allelen an, bei *kaiC* waren es 59% und bei *petB/D* 75% aller Sequenzen. Das gleiche galt für die Sequenztypen. Von den 56 Sequenztypen (ST) kam ein ST 27 mal vor, ein ST kam 13-mal vor und ein weiterer kam 11-mal vor. Dagegen kamen 38 ST nur jeweils ein einziges Mal vor.

**Tabelle 5: Allelprofile einschließlich Anzahl der Individuen für jeden Sequenztyp**

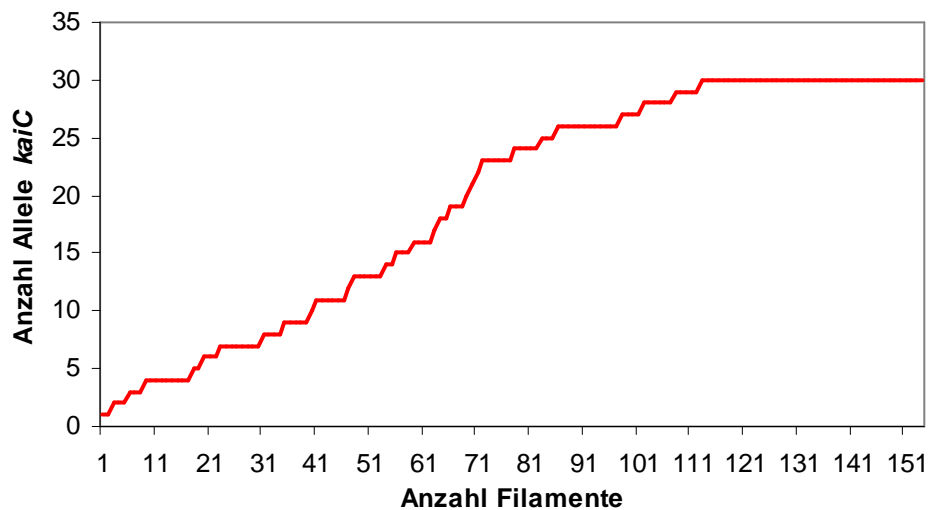
	ST	Allele		
		rDNA-ITS	kaiC	petB/D
NEY2-379	1	1	1	1
NEY2-380	1	1	1	1
NEY2-381	1	1	1	1
NEY2-382	1	1	1	1
NEY2-388	1	1	1	1
MC-NEY-P2-19	2	1	1	2
FWS-17	2	1	1	2
MC-NEY-P2-17	2	1	1	2
MC-NEY-P2-20	2	1	1	2
MEL-4	3	1	2	3
NEY4-298	4	1	3	2
NEY4-339	4	1	3	2
NEY3-397	5	1	3	3
NEY5-360	6	2	3	4
VAR3-2	7	1	4	3
VAR2-03	8	1	4	2
VAR2-15	8	1	4	2
VAR2-16	8	1	4	2
VAR2-18	8	1	4	2
K25-VAR	8	1	4	2
K26-VAR	8	1	4	2
K28-VAR	8	1	4	2
MC-LF13	9	1	5	4
NEY5-361	10	1	5	2
MC-K6-NEY5	10	1	5	2
WIB-17	11	1	6	2
MEL-20	12	1	7	2
FWS-33	13	1	8	3
MC-K8-FWS	13	1	8	3
MC-K5-NEY4	13	1	8	3
VAR4-10	13	1	8	3
VAR4-12	13	1	8	3
VAR4-3	13	1	8	3
VAR4-6	13	1	8	3
VAR4-9	13	1	8	3
MC-MAF	13	1	8	3
NEY1-325	14	1	8	1
FWS-08	15	1	8	2
FWS-22	15	1	8	2
FWS-31	15	1	8	2
NEY4-350	15	1	8	2
MC-MEL	16	1	9	3
NEY3-407	17	1	9	2
MC-K4-NEY4	18	2	10	2
FWS-11	19	2	1	2
MC-LWP	20	2	2	4
FWS-20	21	2	11	2
VAR2-21	22	2	4	2
VAR2-22	22	2	4	2
MC-K10-VAR	22	2	4	2
FWS-05	23	2	12	2
FWS-06	23	2	12	2
FWS-10	23	2	12	2
FWS-23	23	2	12	2
MC-LF12	24	2	5	4
WIB-01	25	2	6	2
WIB-05	25	2	6	2
WIB-06	25	2	6	2
WIB-08	25	2	6	2
WIB-10	25	2	6	2
WIB-13	25	2	6	2
WIB-16	25	2	6	2
WIB-21	25	2	6	2
WIB-25	25	2	6	2
WIB-26	25	2	6	2
WIB-27	25	2	6	2
WIB-28	25	2	6	2
WIB-29	25	2	6	2
WIB-33	25	2	6	2
WIB-38	25	2	6	2
WIB-39	25	2	6	2
WIB-41	25	2	6	2
WIB-42	25	2	6	2
WIB-43	25	2	6	2
WIB-45	25	2	6	2
WIB-50	25	2	6	2
WIB-56	25	2	6	2
WIB-59	25	2	6	2
WIB-67	25	2	6	2
WIB-70	25	2	6	2
WIB-92	25	2	6	2
WIB-93	25	2	6	2
MC-STO	26	2	13	3
MC-SAG	27	2	14	3
MC-WW5	28	2	15	3
VAR5-2	29	2	16	4
MC-K27-FWS	30	2	8	3
MC-K29-FWS	30	2	8	3
NEY1-313	30	2	8	3
MC-K3-NEY3	30	2	8	3
VAR2-04	30	2	8	3
VAR2-20	30	2	8	3
VAR4-11	30	2	8	3
VAR4-2	30	2	8	3
VAR5-1	30	2	8	3
VAR5-3	30	2	8	3
VAR5-5	30	2	8	3
VAR5-6	30	2	8	3
MC-K11-VAR	30	2	8	3
MC-K2-NEY1	31	2	8	4
FWS-18	32	2	8	2
FWS-26	32	2	8	2
NEY1-280	32	2	8	2
NEY1-310	32	2	8	2
NEY1-324	32	2	8	2
NEY1-331	32	2	8	2
MC-K1-NEY1	32	2	8	2
MC-NDN	32	2	8	2

**Tabelle 5: Fortsetzung**

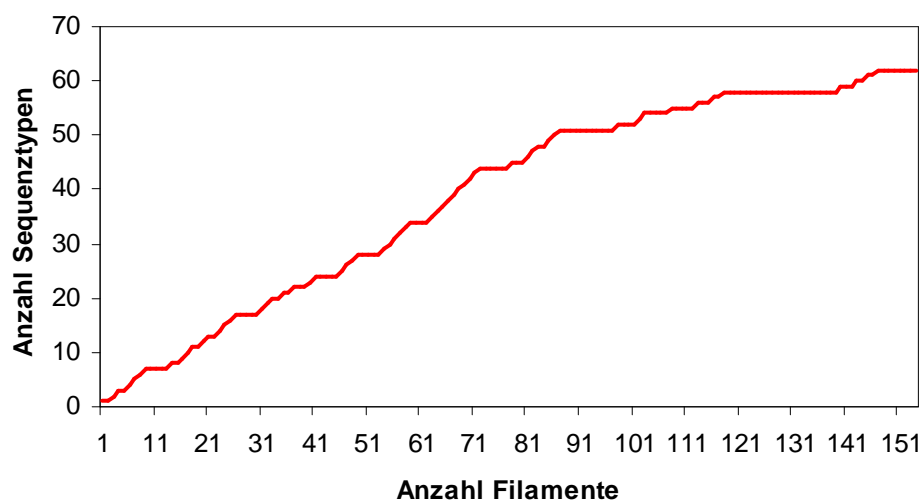
	ST	Allele		
		rDNA-ITS	<i>kaiC</i>	<i>petB/D</i>
MEL-14	32	2	8	2
MC-K7-NEY5	33	3	5	2
VAR4-1	34	4	8	3
WIB-61	35	5	6	2
WIB-83	36	6	6	2
VAR3-3	37	7	17	2
VAR3-5	37	7	17	2
MC-SAH	38	8	18	2
VAR3-6	39	9	3	3
VAR4-4	39	9	3	3
VAR4-5	39	9	3	3
WIB-15	40	9	6	2
WIB-18	40	9	6	2
WIB-85	40	9	6	2
WIB-87	40	9	6	2
WIB-89	40	9	6	2
WIB-04	41	10	6	2
WIB-91	41	10	6	2
WIB-76	42	11	6	2
MC-K9-VAR	43	12	4	2
NEY2-286	44	13	3	2
NEY4-296	45	13	4	2
VAR3-1	46	13	4	3
FWS-07	47	14	8	3
WIB-102	48	15	19	5
WIB-110	48	15	19	5
WIB-112	48	15	19	5
WIB-113	48	15	19	5
WIB-114	48	15	19	5
WIB-118	48	15	19	5
WIB-23	48	15	19	5
WIB-32	48	15	19	5
WIB-82	48	15	19	5
WIB-94	48	15	19	5
WIB-98	48	15	19	5
WIB-86	49	15	19	6
MC-EDA	50	16	20	7
MC-ASK5	51	17	21	7
MC-WIS	52	18	22	8
MC-LZW	53	18	23	8
VAR3-7	54	18	24	8
NEY3-289	55	19	25	5
WIB-116	56	15	26	9
WIB-24	56	15	26	9
WIB-30	56	15	26	9

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen Stichprobengröße und Anzahl der Allele (Abbildung 6 am Beispiel *kaiC*) zeigt sich, dass bei einer Stichprobengröße über 100 die Anzahl der gefundenen Allele kaum zunahm. Es ist daher anzunehmen, dass die Stichprobengröße in dieser Region für Vergleiche innerhalb einzelner Genloci ausreichend war. Bei dem Vergleich zwischen Stichprobengröße und Anzahl der Sequenztypen (Abbildung 7) war eine Abflachung der Kurve mit Zunahme der

Stichprobengröße zu erkennen. Auch wenn die Anzahl der Sequenztypen mit einer größeren Stichprobenzahl vermutlich noch angestiegen wäre, ist auch hier erkennbar, dass die größte Zunahme bei einer Stichprobengröße von bis zu 100 Proben lag. Auch hier konnte die Stichprobengröße als ausreichend für die Diversitätsuntersuchungen in diesem Kapitel beziehungsweise für Datensätze mit nicht zu großer Variabilität angesehen werden.



**Abbildung 6:** Zusammenhang zwischen Stichprobengröße und Anzahl der Allele am Beispiel von *kaiC*.



**Abbildung 7:** Zusammenhang zwischen Stichprobengröße und Anzahl der Sequenztypen.

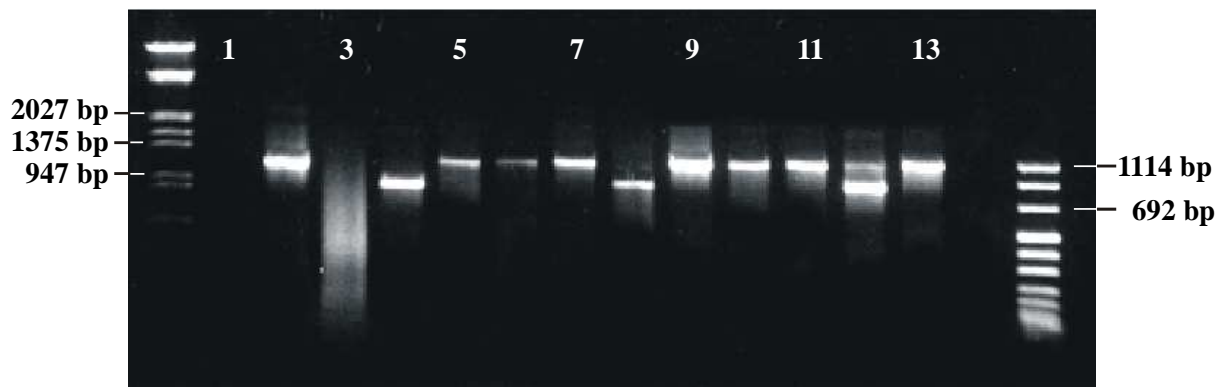
Während viele Allele unabhängig von der geographischen Lage der zugrundeliegenden Proben an mehreren Standorten vorkamen, gab es auch Allele, die auf einen Standort beschränkt waren. Für den *kaiC*-Locus betraf das zum Beispiel sämtliche Sequenzen der Wismar-Proben, die alle eigenen Allelen zugeordnet waren (siehe Abbildung 9 in Kapitel 4.3.1.2 sowie Tabelle 5). Das traf allerdings nur eingeschränkt für die rDNA-ITS-Region und für *petB/D* zu. Beim *petB/D* Genlocus gab es dagegen ein Allel, dem nur Individuen aus Norderney angehörten (z. B. NEY2-388, siehe Abbildung 9 und Tabelle 5). Anders sah es aus, wenn die Allelprofile betrachtet wurden. Von allen Sequenztypen, die mehr als einmal vorkamen, gab es zwei Sequenztypen, die in Nordsee- und Ostsee-Proben vorkamen, sieben Sequenztypen die nur in Nordsee-Proben vorkamen und neun Sequenztypen, die nur in den Ostseeproben vorkamen. Von den 16 Sequenztypen die nur auf die Nordsee- oder Ostseeregion beschränkt waren, kamen zehn Sequenztypen jeweils nur an einem Standort vor (Varberg, Norderney, Fedderwardersiel oder Wismar).

Es gab eine deutliche Aufteilung der Individuen in zwei Gruppen (Abbildung 9 in Kapitel 4.3.1.2). Zur Gruppe 1 zählen die Cluster NO-I bis NO-VII, während der Cluster NO-VIII die zweite Gruppe bildet. Zwischen den Gruppen konnte eine hohe Sequenzvariabilität beobachtet werden (ungefähr 2% beim Vergleich zweier Vollsequenzen des 16S rRNA Gens; 19% Variabilität in der ITS-Region, 7% in der *kaiC*-Region und 2.5% in der *petB/D*-Region). Innerhalb der Gruppen war die Variabilität oftmals wesentlich geringer (zum Beispiel in der ITS-Region 4% Variabilität, *kaiC* 5% Variabilität). Sowohl die geringe Sequenzvariabilität in dem 16S rRNA Gen als auch die Morphologie der in den unterschiedlichen Gruppen vorkommenden Kulturen zeigten nach dem jetzigen Artenverständnis, dass beide Gruppen der Art *Microcoleus chthonoplastes* angehören und dass diese Art eine hohe innerartliche Variabilität aufweist.

Um schon während der PCR zwischen Individuen der zwei Hauptgruppen, Cluster NO-I bis NO-VII einerseits und Cluster NO-VIII andererseits, unterscheiden zu können, wurde für die Analyse der Proben aus der Wismarer Bucht ein PCR-Ansatz mit drei Primern entwickelt. Neben den in der rDNA-ITS für *M. chthonoplastes* spezifischen Primern Mic731F und Mic1728R wurde ein weiterer Primer entwickelt,



der nur dann innerhalb der ITS-Region bindet, wenn die Proben das für den Cluster NO-VIII typische Sequenzmuster an dieser Stelle aufweisen. In Abbildung 8 ist ein solches Bandenmuster von unterschiedlichen Wismar-Proben dargestellt. In den Spuren 2, 5 bis 7, und 9 bis 11 wurden Proben vervielfältigt, die zu den Clustern NO-I bis NO-VII gehören. In diesem Fall konnten nur die Primer Mic731F und Mic1728R binden. Das PCR-Produkt hat eine Länge von nicht ganz 1000 Basenpaaren. Bei den Filamenten in den Spuren 4 und 8 handelte es sich dagegen um Proben die zum Cluster NO-VIII gehörten. Der für diesen Cluster spezifische Primer konnte in der ITS-Region binden und die PCR-Produkte wiesen daher nur eine Länge von ungefähr 850 Basenpaaren auf, wie auf dem Gel-Elektrophorese Foto durch die veränderte Lage der Bande erkennbar ist. Die Spuren 12 (Wismar-Kultur aus Cluster NO-VIII) und 13 (MC-NEY-P2-19 aus Cluster NO-II) zeigen die Positivkontrollen, Spur 14 (destilliertes Wasser) die Negativkontrolle. In Spur 1 ist keine Amplifizierung erfolgt, das PCR-Produkt in Spur 3 konnte nicht *M. chthonoplastes* zugeordnet werden.



**Abbildung 8:** PCR-Produkte einzeln gepickter Filamente nach der Amplifikation mit den drei Primern Mic731F, 1728R und MicITSR. Spur 2, 5 – 7, 9 – 11: PCR-Produkte von Filamenten der Gruppe 1; Spur 4, 8: PCR-Produkte von Filamenten der Gruppe 2; Spur 12: MC-WIS (Gruppe 2); Spur 13: MC-NEY-P2-19 (Gruppe 1); Spur 14: H<sub>2</sub>O.

Diese Methode ist eine einfache und effiziente Methode zur schnellen Bestimmung der Clusterzugehörigkeit von Filamenten. Auf diese Weise wurden 127 Filamente aus der Wismarer Bucht untersucht und ein Verhältnis der Clusterzugehörigkeit von ungefähr 3:1 (Cluster NO-I bis NO-VII: 94 Filamente, Cluster NO-VIII: 33 Filamente)

herausgefunden. Filamente, die dem Cluster NO-VIII angehören, scheinen im Nordsee- und Ostseebereich deutlich seltener vorzukommen als Filamente, die den Clustern NO-I bis NO-VII angehören. Dies zeigt sich auch besonders für die Standorte Norderney, Fedderwardersiel und Varberg. Im Cluster NO-VIII waren nur sehr wenige Sequenzen von Filamenten dieser Standorte zu finden (neben den in Abbildung 9 gezeigten Proben NEY3-289 und VAR3-7 noch ein weiteres Filament aus Norderney, das aufgrund fehlender *petB/D*-Sequenz nicht in die Berechnung eingegangen ist), aus Fedderwardersiel kein einziges Filament.

Ein Nachteil der Methode war, dass für eine weitere Sequenzierung der Proben, die bei der PCR kürzere Banden zeigten, eine weitere PCR mit den zwei regulären Primern durchgeführt werden musste. Die Sequenzen in der ITS-Region wären sonst nicht vollständig gewesen.

### 3.3.1.2 Phylogenie

Phylogenetische Bäume wurden auf der Basis der Nukleotidsequenzen für alle drei Genloci erstellt. Die Bäume wurden mit der Neighbor-Joining-, Maximum Parsimony- und Maximum-Likelihood-Methode berechnet. Alle drei Berechnungsmethoden zeigten die Zuordnung der Sequenzen in acht Cluster, einer dieser Cluster grenzte sich deutlich von den anderen Sequenzclustern ab. In Abbildung 9 sind die Neighbor-Joining-Bäume für alle drei Genloci dargestellt. Aufgrund der Größe der Bäume mit allen 153 Sequenzen wurde zur besseren Darstellung in der Abbildung stattdessen für jeden Sequenztypen nur eine Sequenz ausgewählt.

Der Vergleich der drei Bäume in der Abbildung zeigt, dass die Clusterbildung innerhalb der Cluster NO-I bis NO-VII zwischen den Genen nicht kongruent ist. Sequenzen, die in dem für ein Gen berechneten Baum identisch oder ähnlich sind, unterscheiden sich in den anderen Genbäumen teilweise stark voneinander. Diese Inkongruenz zwischen Genbäumen lässt auf Rekombination zwischen den Individuen schließen. Die Bootstrap-Werte innerhalb und zwischen den Clustern waren oftmals niedrig, die meisten Werten lagen zwischen 25% und 70%, bei einem Bootstrap von 1000 Wiederholungen. Cluster NO-VIII dagegen war in jedem der Bäume ein eigenständiger Cluster. Die Bootstrap-Werte zwischen diesem und den anderen sieben Clustern lagen jeweils bei 100%. Sequenzen von Filamenten, die in diesen Cluster fielen, wurden in keinem der Bäume in anderen Clustern entdeckt.

Der Cluster setzte sich aus Proben unterschiedlicher geographischer Regionen zusammen, sowohl aus dem Nordsee- als auch aus dem Ostseebereich, allerdings überwogen Proben die aus dem südlichen Ostseebereich (vor allem Wismar) stammten. Das kann allerdings mit der gezielten Suche mittels spezifischer PCR zusammenhängen (s. 4.3.1.1). Innerhalb dieses Clusters konnten nur sehr wenige Inkongruenzen festgestellt werden: drei Sequenzen, die sowohl in den Genbäumen für *kaiC* als auch *petB/D* eine eigenständige Gruppe gebildet haben, waren in dem rDNA-ITS Genbaum identisch mit einer Gruppe von 12 weiteren Sequenzen.

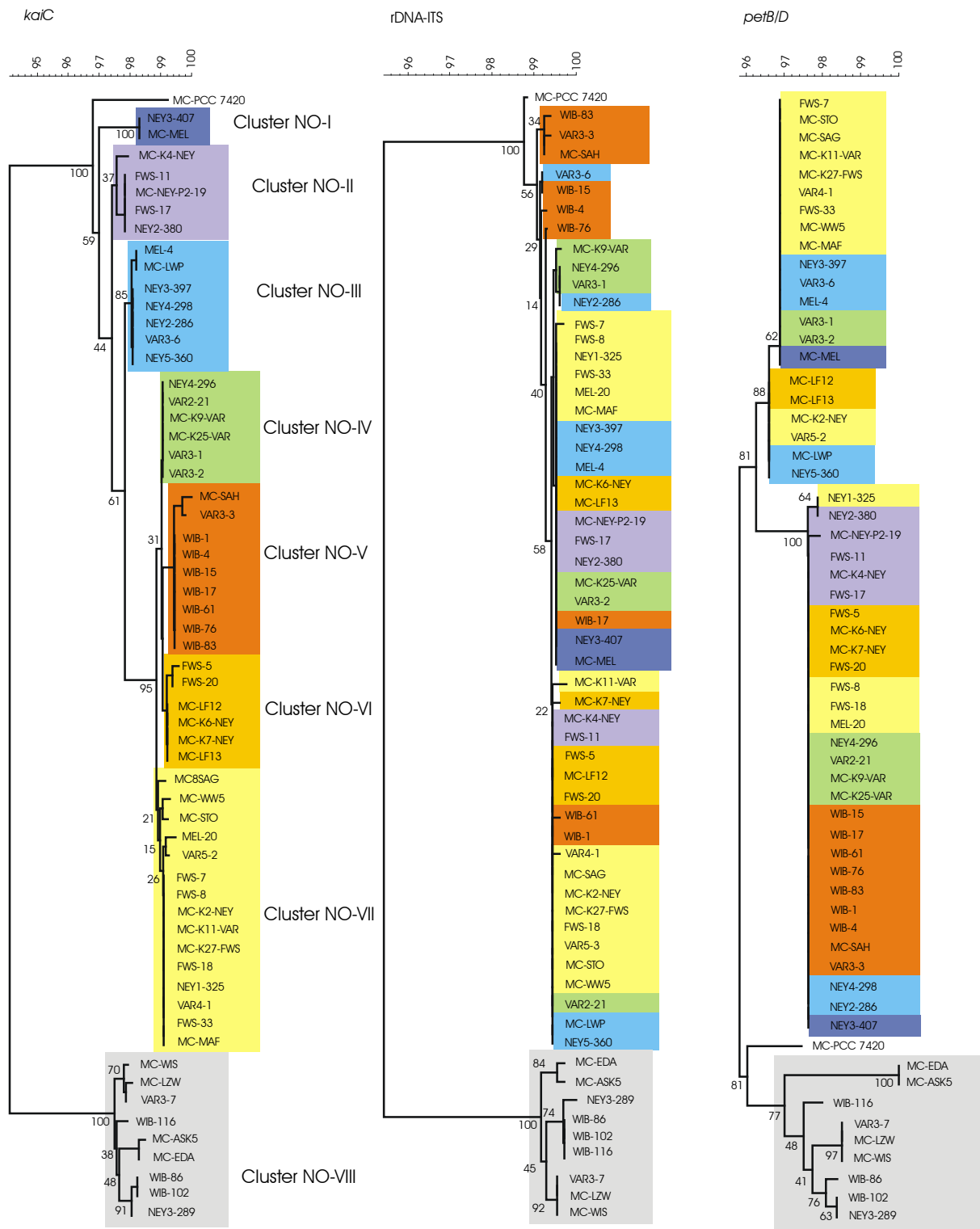
### 3.3.1.3 Rekombination

Neben dem Vergleich der phylogenetischen Bäume hinsichtlich ihrer Kongruenz (s. 4.3.1.2) wurden der Assoziationsindex, Splitstree-Analysen sowie der ILD-Test zur Untersuchung möglicher Rekombination herangezogen.

#### Assoziationsindex ( $I_A$ )

Der Assoziationsindex für die Allele der drei Genloci für alle 153 Proben lag bei 0.429 mit signifikantem Koppelungsungleichgewicht (bei 1000 zufälligen Wiederholungen). Für die einzelnen Standorte lag der Index für Fedderwardersiel bei -0.003, für Norderney bei 0.213, für Varberg bei 0.608 mit signifikantem Koppelungsungleichgewicht und für Wismar bei 1.368 mit signifikantem Koppelungsungleichgewicht.

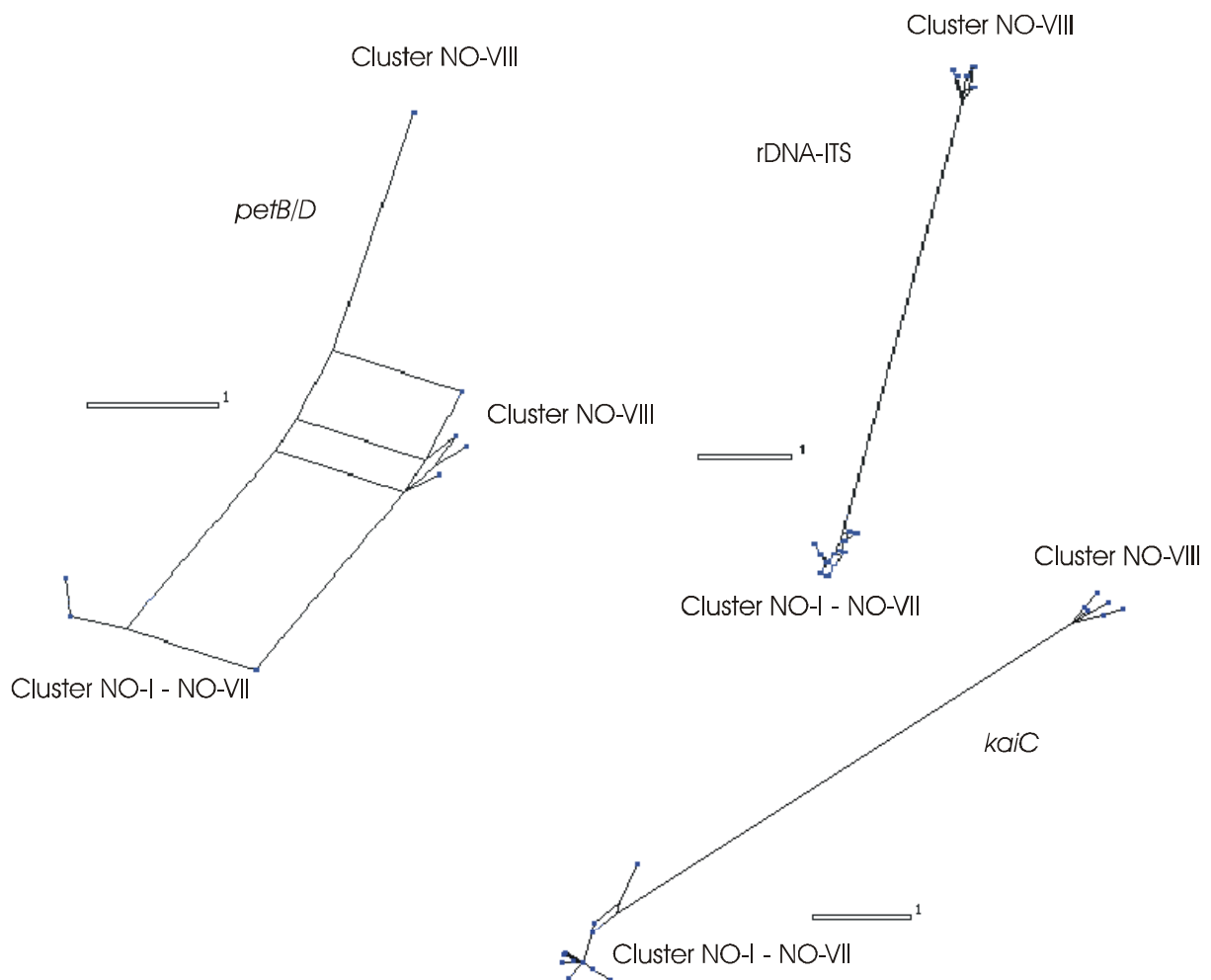
Wurden dagegen nur Proben aus den Clustern NO-I bis NO-VII für die Berechnung herangezogen, lag der Assoziationsindex für alle 133 Proben bei 0.224. Es konnte kein Koppelungsungleichgewicht entdeckt werden. Für die einzelnen Standorte ergaben sich Änderungen für Norderney ( $I_A = 0.156$ ), Varberg ( $I_A = 0.567$  mit signifikantem Koppelungsungleichgewicht) und ganz deutlich für Wismar mit einem  $I_A$  von 0.001 nach Herausnahme der Proben, die in den Cluster NO-VIII fielen. Diese Werte (mit Ausnahme von Varberg) lassen auf häufige Rekombination innerhalb der Cluster NO-I bis NO-VII schließen. Innerhalb des Clusters NO-VIII war der Assoziationsindex dagegen mit 1.254 hoch (21 Proben) und signifikantes Koppelungsungleichgewicht wurde entdeckt. Zwischen den Clustern NO-I bis NO-VII einerseits und Cluster NO-VIII andererseits konnte keine Rekombination festgestellt werden.



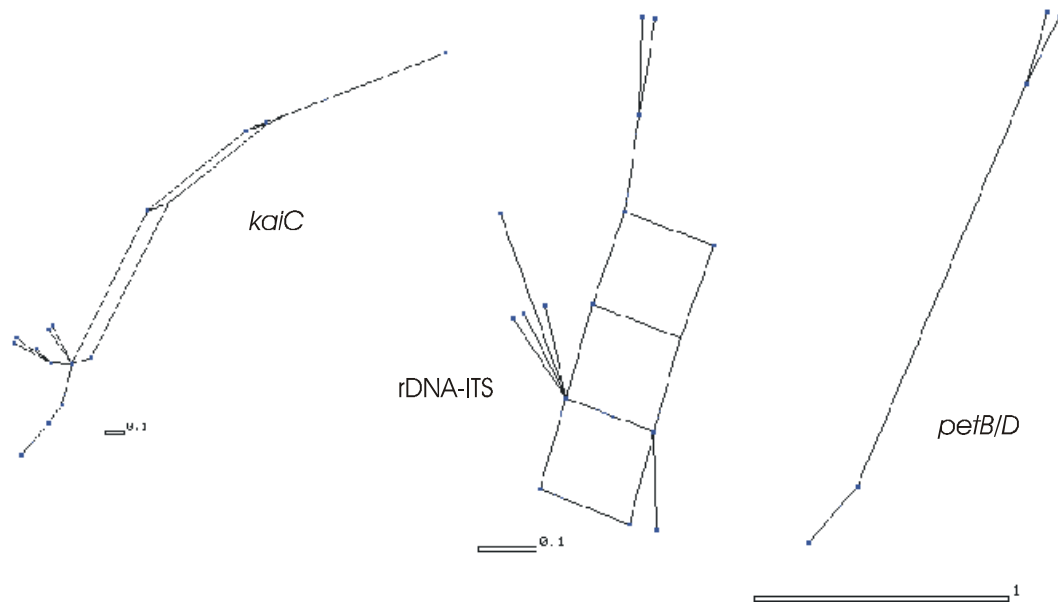
**Abbildung 9:** Phylogenetische Bäume für alle drei Genloci. Die Berechnung erfolgte nach der Neighbor-Joining-Methode. Es wurde für jeden Sequenztyp nur eine Sequenz verwendet.

### Split decomposition Analyse

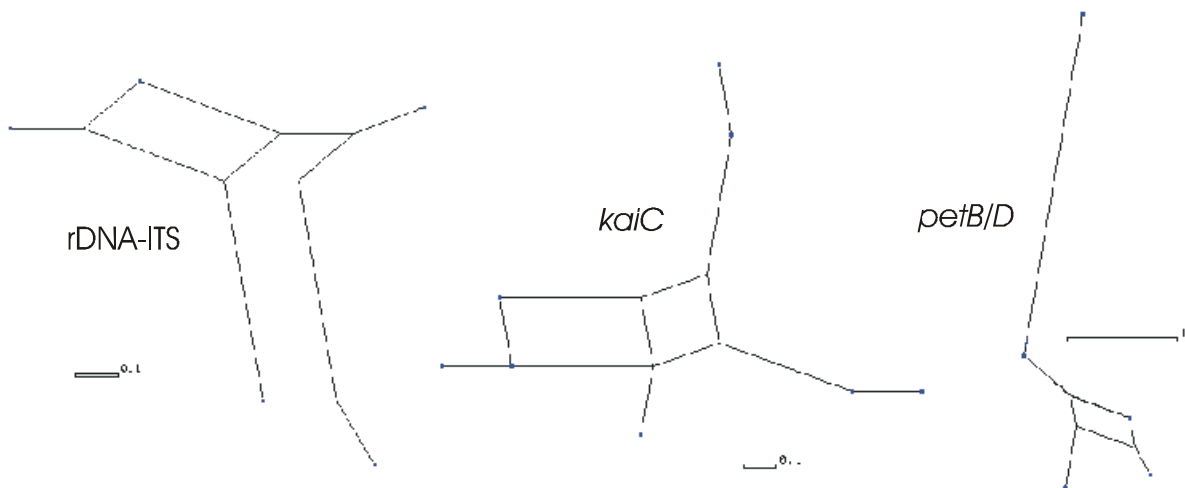
Splitstrees wurden sowohl für alle Proben als auch getrennt für die Clustergruppe NO-I bis NO-VII einerseits und für den Cluster NO-VIII andererseits berechnet. Die Splitstrees für die Genloci *rDNA-ITS* und *kaiC* zeigten keinerlei Netzwerkstrukturen zwischen den beiden Clustergruppen (Abbildung 10). Sowohl innerhalb der Gruppe NO-I bis NO-VII als auch des Clusters NO-VIII konnten dagegen Netzwerkstrukturen entdeckt werden, die auf Rekombination innerhalb der Gene hindeuteten (Abbildung 11a + b). Bei *petB/D* wurden Netzwerke sowohl zwischen den Clustergruppen als auch innerhalb des Clusters NO-VIII entdeckt. Wurden dagegen nur Filamente der Cluster NO-I bis NO-VII für die Berechnung verwendet, konnten keine Netzwerkstrukturen erkannt werden.



**Abbildung 10:** Splitstrees für alle drei Genloci.



**Abbildung 11a:** Splittrees für die Cluster NO-I bis NO-VII.



**Abbildung 11b:** Splittrees für den Cluster NO-VIII.

### ILD-Test

Der ILD-Test wurde nur für die Cluster NO-I bis NO-VII durchgeführt, da dies diejenigen Cluster sind, die in den phylogenetischen Bäumen für die drei Gene inkongruent zueinander waren. Der ILD-Test bestätigte diese Beobachtung. Alle Kombinationen zeigten Inkongruenzen zwischen den Partitionen. Die Werte waren wie folgt:

rDNA-ITS – <i>kaiC</i>	p = 0.03
rDNA-ITS – <i>petB/D</i>	p = 0.02
<i>kaiC</i> – <i>petB/D</i>	p = 0.01
rDNA-ITS – <i>kaiC</i> – <i>petB/D</i>	p = 0.01

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p = 0.05$ ) war die Summe der Länge der kombinierten Bäume jeweils signifikant größer als die der Originalbäume. Das bedeutet, dass die Inkongruenz zwischen den Datensätzen zu groß war, als das sie alleine aufgrund von Zufall zu erklären gewesen wäre. Die Ergebnisse des ILD-Tests sind also weitere Indizes für das Vorhandensein von Rekombination innerhalb dieser Cluster.

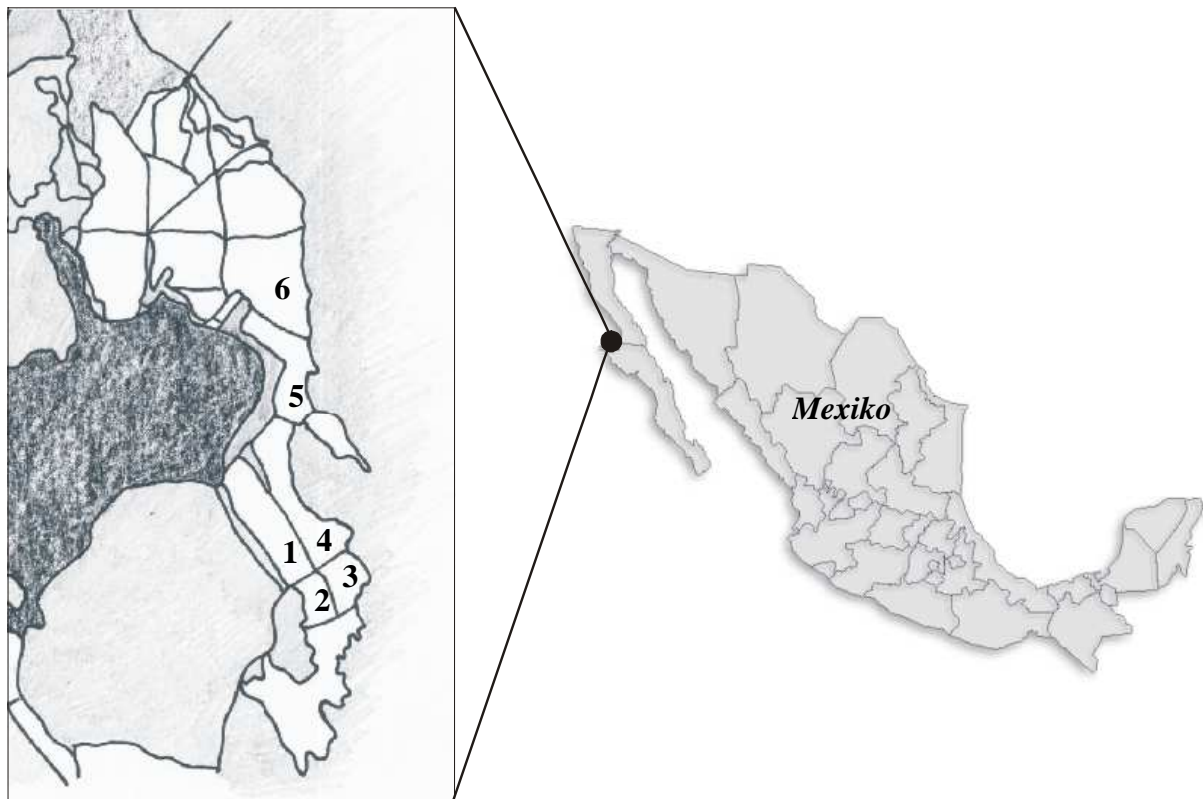
### 3.3.2 Baja California

Die Proben aus Baja California, Mexiko stammten aus mikrobiellen Matten innerhalb der Saline der Exportadora de Sal-Gesellschaft in Guerrero Negro (Abbildungen 12 und 13).

Die mikrobiellen Matten der Saline in Guerrero Negro gehören zu den am besten untersuchten Matten weltweit (z. B. Nübel et al., 1999; Des Marais, 1995; Javor, 1983). Die Saline besteht aus einem System hintereinandergeschalteter Salzponds mit zunehmender Salinität in Relation zur zunehmenden Entfernung zum Meer. Das Meerwasser wird in den ersten Pond geleitet und von dort ausgehend nacheinander in die folgenden Ponds. Aufgrund der hohen Evaporationsrate in diesem heißen, trockenen Klima nimmt die Salinität in jedem Pond zu. Eine schematische Ansicht des Pondsystems wird in Abbildung 13 gezeigt. *Microcoleus*-Matten konnten hauptsächlich in den Ponds 2 bis 6 gefunden werden. Die daran anschließenden Ponds hatten eine zu hohe Salzkonzentration, um *Microcoleus*-dominierte Matten auszubilden.



**Abbildung 12:** Fotos mikrobieller Matten in der Saline in Guerrero Negro (eigene Aufnahmen).



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der Evaporationsponds in der Saline in Guerrero Negro, Baja California. 1 – 6: Pond 1 bis Pond 6 (eigene Zeichnung).

Es wurden 93 Filamente entlang eines Salinitätsgradienten miteinander verglichen. Die Proben stammen aus den Ponds 2 bis 6 mit folgenden, aufsteigenden Salinitäten: 7 % (Pond 2), 8 – 8.5 % (Pond 3 und 4), 10 % (Pond 5) und 15 % (Pond 6).



### 3.3.2.1 Diversität

In den Sequenzen konnte eine hohe Diversität entdeckt werden. Die Anzahl der Allele, variablen Positionen und Länge der Sequenzen kann Tabelle 6 entnommen werden. Mit bis zu 81 variablen Positionen zeigte die *kaiC*-Region die höchste Variabilität. Die Anzahl der Polymorphismen in dem 16S rRNA Gen-Teilabschnitt war gering: es konnten insgesamt 14 variable Positionen entdeckt werden. Acht dieser Polymorphismen befanden sich in einem Teilabschnitt von ca. 40 Nukleotiden Länge und weitere drei Polymorphismen in einem Teilabschnitt von 10 Nukleotiden Länge in einem näher an der ITS liegenden Bereich des 16S rRNA Gens. Die restlichen Polymorphismen waren auf die Sequenz verteilt.

**Tabelle 6: Länge der Sequenz, Anzahl der Allele, synonyme und informativer Polymorphismen für die einzelnen Genloci**

Locus	Länge der Sequenz	Allele	Anzahl variabler Positionen	Anzahl informativer Polymorphismen
rDNA-ITS	510	24	76	72
16S rDNA	296		14	12
ITS	214		62	60
<i>kaiC</i>	479	19	81 / 70 <sup>a</sup>	78 / 70 <sup>a</sup>
<i>petB/D</i>	420	13	45	40 / 39 <sup>a</sup>
<i>petB</i>	324		28 / 24 <sup>a</sup>	25 / 24 <sup>a</sup>
<i>pet</i> -IGS	96		17	15

<sup>a</sup> synonyme Positionen

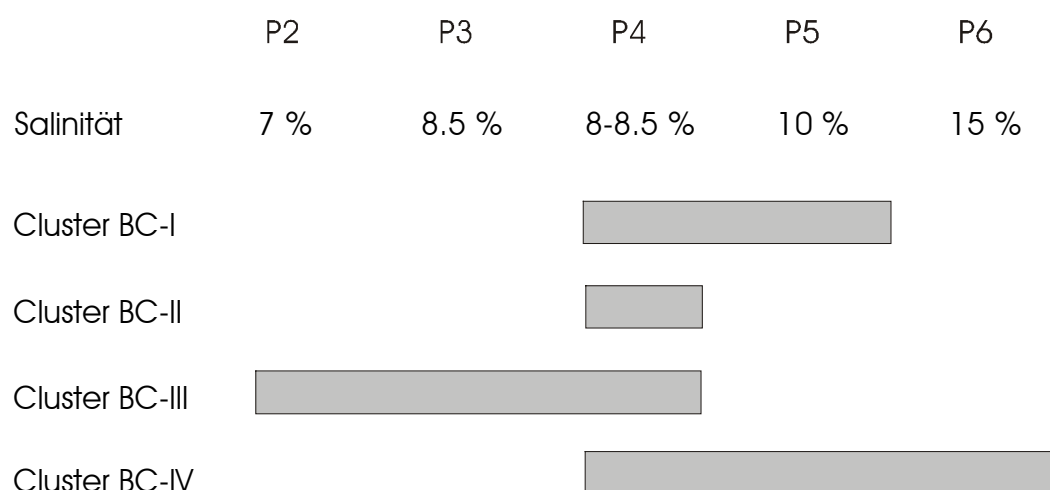
Als Referenzstamm wurde der als *Microcoleus chthonoplastes* identifizierte Stamm PCC 7420 für Vergleiche des 16S rRNA Gens verwendet. Im Vergleich zu dieser Kultur zeigten 32 Filamente identische 16S rRNA Gen-Teilsequenzen. Die anderen Filamente unterschieden sich an einer bis acht Positionen. Als Außengruppe bei der Erstellung der phylogenetischen Bäume wurden zwei Sequenzen aus der Nordsee- und Ostsee-Region verwendet.

Die meisten Polymorphismen waren synonym und informativ (Tabelle 6). Für die 93 untersuchten Filamente innerhalb des Pondsystems konnten 44 unterschiedliche Sequenztypen entdeckt werden. Die meisten Filamente konnten zwei Sequenztypen zugeordnet werden. 38 der 44 Sequenztypen kamen jeweils nur einmal vor, was auf eine hohe Diversität schließen lässt. Dies konnte auch für die Allele der einzelnen

Genloci beobachtet werden. An jedem Locus gab es zwei dominierende Allele sowie viele Allele, die nur einmal vorkamen (vgl. auch Tabelle 7.1 im Anhang).

### 3.3.2.2 Ökologische Gradienten und räumliche Verteilung

Es wurde die Variabilität der Nukleotidsequenzen von den Filamenten entlang des Salinitätsgradienten untersucht. Der Vergleich der Phylogenien zeigte, dass die Filamente aus Pond 2 und 3 zusammen in einer Gruppe vorkamen und in keiner der anderen Gruppen zu finden waren. Ebenso kamen Filamente aus Pond 6 nur in einer Gruppe vor. Filamente aus Pond 4 kamen zum Teil mit Filamenten aus Pond 2 und 3 vor sowie mit Filamenten aus Pond 5. Filamente aus letzterem Pond kamen schließlich auch noch mit Filamenten aus Pond 6 in einer Gruppe vor, dafür nicht mit Filamenten aus Pond 2 und 3. In Abbildung 14 ist das Verteilungsmuster grafisch dargestellt. Dieses Schema ließ sich für alle drei untersuchten Genloci anwenden.



**Abbildung 14:** Verteilung der Sequenzen entlang des Salinitätsgradienten.

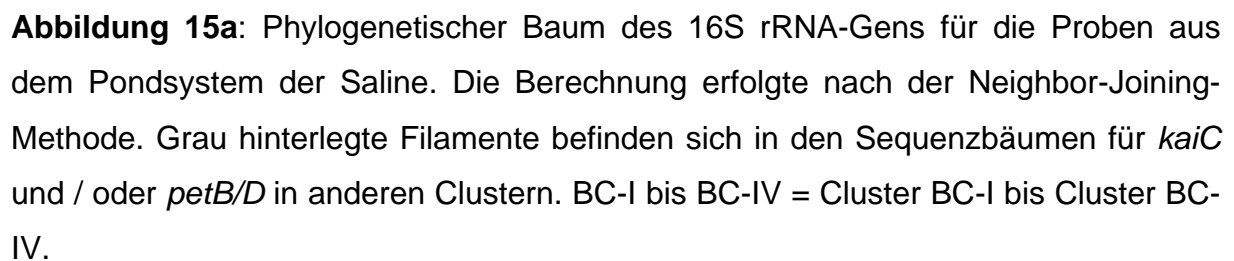
Der Vergleich zeigt, dass sich die Populationen entlang des Salinitätsgradienten verteilen, wie für die einzelnen Gruppen beschrieben wurde. Es kam dabei nicht zu einer strikten Trennung der Populationen zwischen den einzelnen Ponds, sondern zu einer Überlappung derselben. In Pond 4 waren zum Beispiel drei der vier Populationen anzutreffen. Es war ein Übergang zwischen den Populationen, die in geringeren Salzkonzentrationen wachsen, zu den Populationen in höheren Salzkonzentrationen zu beobachten, mit einer langsamen Ablösung der einzelnen Populationen innerhalb der Ponds.

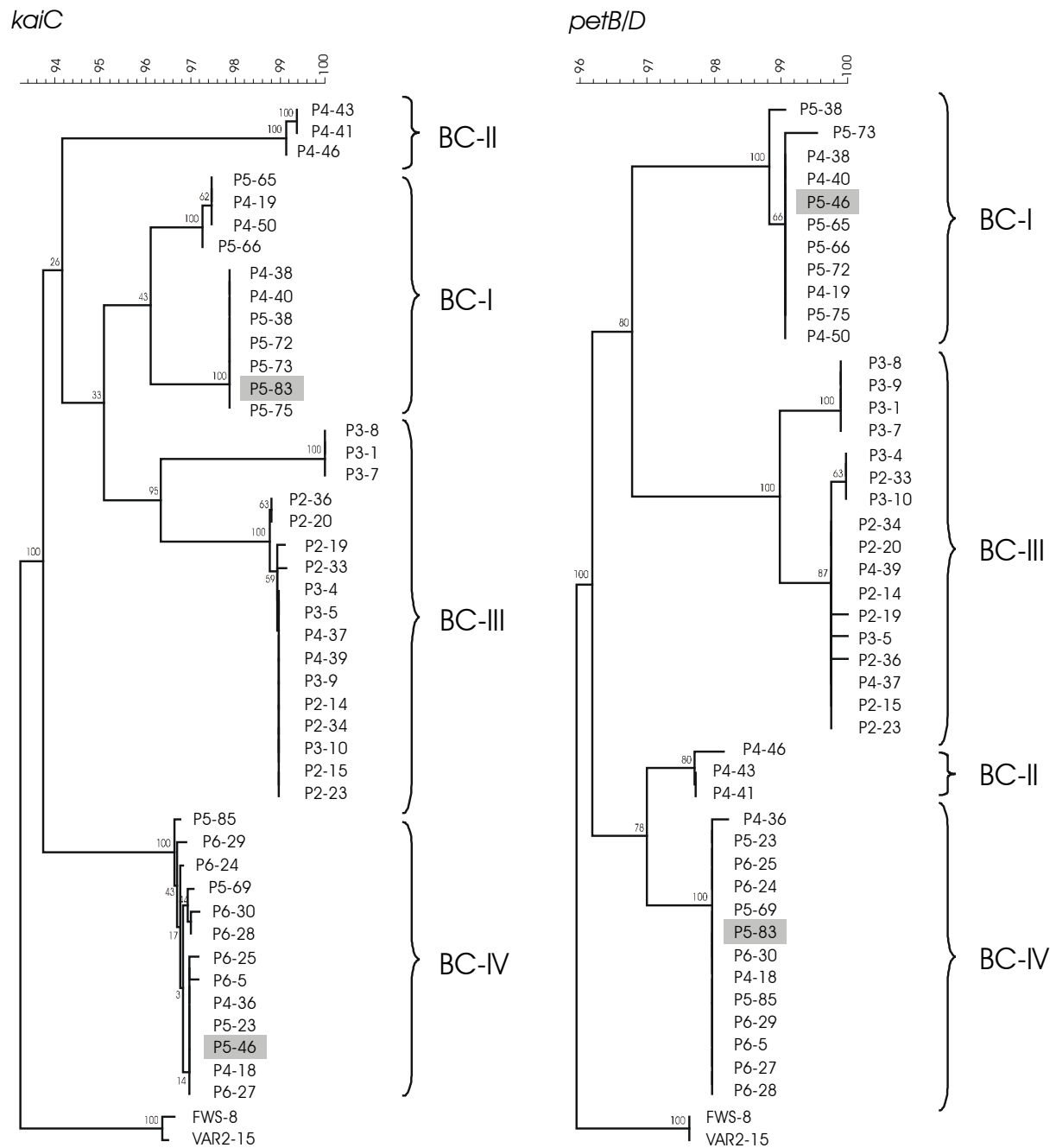
Ponds, in denen mehr als eine Population vorkam, hatten erwartungsgemäß eine höhere Variabilität in den Nukleotidsequenzen der untersuchten Filamente sowie eine größere Anzahl an Allelen und Sequenztypen.

### **3.3.2.3 Phylogenie**

Phylogenetische Bäume wurden mit der Neighbor-Joining-, Maximum Parsimony-, und Maximum Likelihood-Methode erstellt. Alle Methoden zeigten dieselbe Gruppierung der Filamente in vier Cluster (BC-I bis BC-IV). Die Bootstrap-Werte waren teilweise sehr niedrig, mit einer Unterstützung des jeweiligen Baumes von teilweise nur 23 bis 25 %, was auf widersprüchliche Phylogenien und Inkongruenzen innerhalb der Bäume hindeutet.

Die Neighbor-Joining-Bäume für die drei Genloci sind in Abbildung 15a + b dargestellt. Alle drei Bäume und damit Gene zeigten die Ausbildung von vier unterschiedlichen Gruppen beziehungsweise Clustern. Da diese Gruppierung für alle drei Gene eingehalten wurde, handelt es sich vermutlich um vier Populationen, die innerhalb der Ponds vorkommen. Einige wenige Filamente konnten in den unterschiedlichen Bäumen in unterschiedlichen Gruppen wiedergefunden werden, was auf Rekombination zwischen den Gruppen hinweisen könnte. Es handelte sich dabei ausschließlich um Filamente aus Pond 5. Die aus diesem Pond, wie auch aus Pond 4 stammenden Filamente konnten in mehreren der vier phylogenetischen Cluster wiedergefunden werden. Dagegen kamen Filamente aus den Ponds 2 und 3 nur in einem Cluster vor, ebenso Filamente aus Pond 6. Innerhalb der Gruppen war die Variabilität zum Teil sehr gering, mit vielen identischen Nukleotidsequenzen. Die Kongruenz der Bäume innerhalb einzelner Gruppen konnte daher nicht aussagekräftig untersucht werden.





**Abbildung 15b:** Phylogenetische Bäume des *kaiC* Gens und des *petB/D* Gens für die Proben aus dem Pondsystm der Saline. Die Berechnung erfolgte nach der Neighbor-Joining-Methode. Es wurde für jeden Sequenztyp nur eine Sequenz verwendet. Grau hinterlegte Filamente befinden sich in den Sequenzbäumen in unterschiedlichen Clustern. BC- I bis BC-IV = Cluster BC-I bis Cluster BC-IV.

### 3.3.2.4 Rekombination

#### Assoziationsindex

Der Assoziationsindex für die Allele der Genloci war für alle 93 Filamente mit 1.218 hoch. Signifikantes Koppelungsungleichgewicht wurde entdeckt. Beim Vergleich der einzelnen Ponds konnten niedrige Indizes für Filamente in den Ponds 3 und 6 gefunden werden. In den Ponds 4 und 5, in denen Filamente mehrerer Gruppen vorkamen und die daher eine hohe Diversität aufwiesen, waren die Indizes hoch. In Pond 5 konnte signifikantes Koppelungsungleichgewicht entdeckt werden. Die einzelnen Indizes sind in Tabelle 7 aufgelistet. Innerhalb der einzelnen Gruppen waren die Indizes teilweise sehr niedrig (z.B. in Gruppe BC-IV: -0.194, Gruppe BC-I: 0.067), auch wenn es Gruppen mit höheren Indizes gab (z.B. Gruppe BC-III: 0.553).

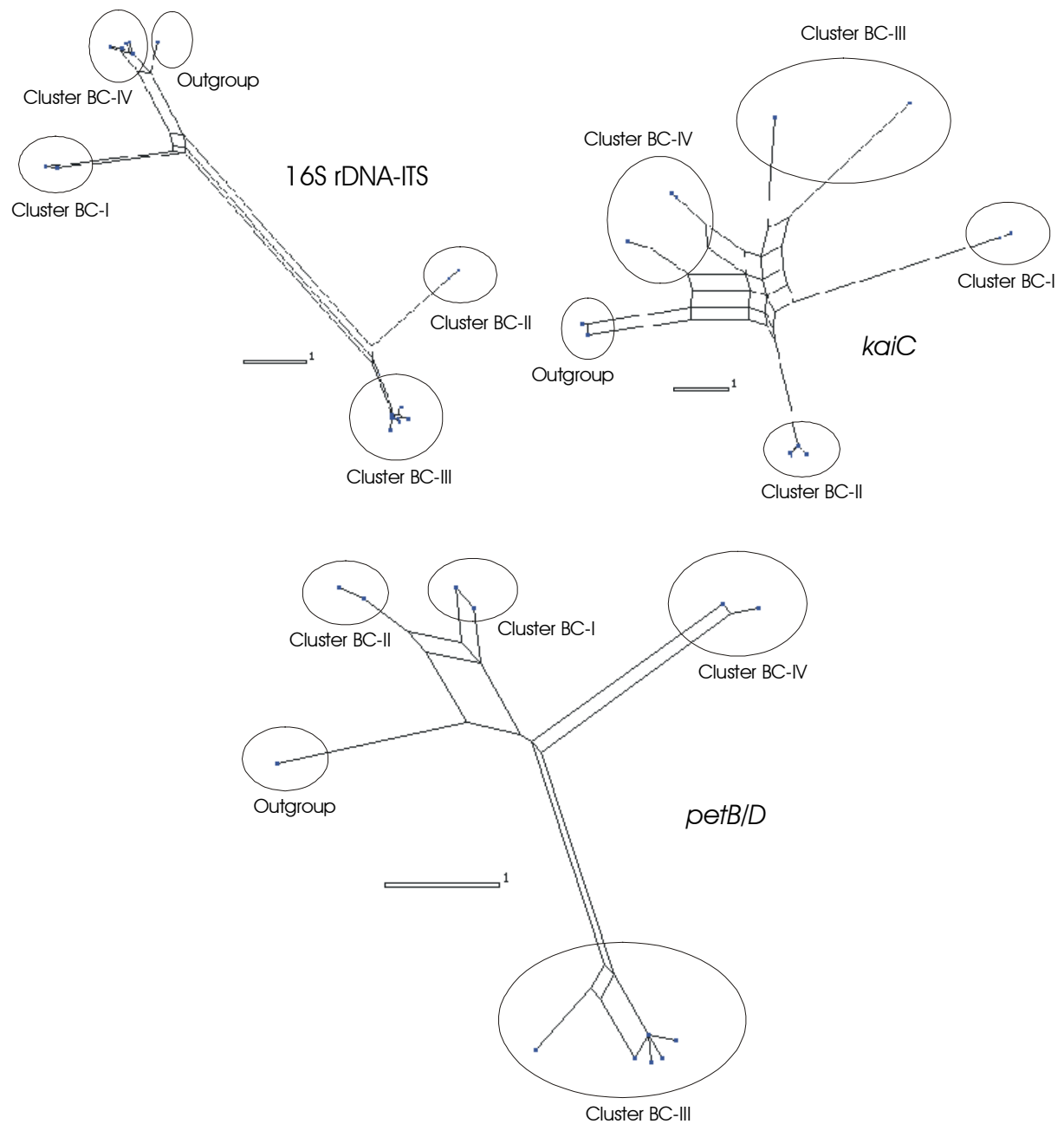
**Tabelle 7: Assoziationsindizes für die einzelnen Ponds und phylogenetischen Cluster**

	Anzahl Filamente	Assoziationsindex
Pond 2	15	0.631
Pond 3	8	0.200
Pond 4	15	1.037
Pond 5	40	1.083 sign. LD <sup>a</sup>
Pond 6	15	-0.171
Cluster BC-I	34	0.067
Cluster BC-II	4	0.968
Cluster BC-III	25	0.553
Cluster BC-IV	30	-0.194

<sup>a</sup>Sign. LD: signifikantes Koppelungsungleichgewicht  
(linkage disequilibrium)

#### Split decomposition Analyse

Splittrees für alle Filamente und alle drei Gene sind in Abbildung 16 abgebildet. Für alle drei Gene zeigten die Splittrees Netzwerkstrukturen, was auf Rekombination innerhalb der Gene hindeuten kann.



**Abbildung 16:** Splittrees für alle 93 sequenzierten Filamente und alle drei Gene. Die Einordnung der Filamente in die einzelnen Cluster ist aus Abbildung 15 zu entnehmen. Outgroup: Filamente FWS-8 (Fedderwardsiel, Deutschland) und VAR2-15 (Varberg, Schweden).

### **ILD-Test**

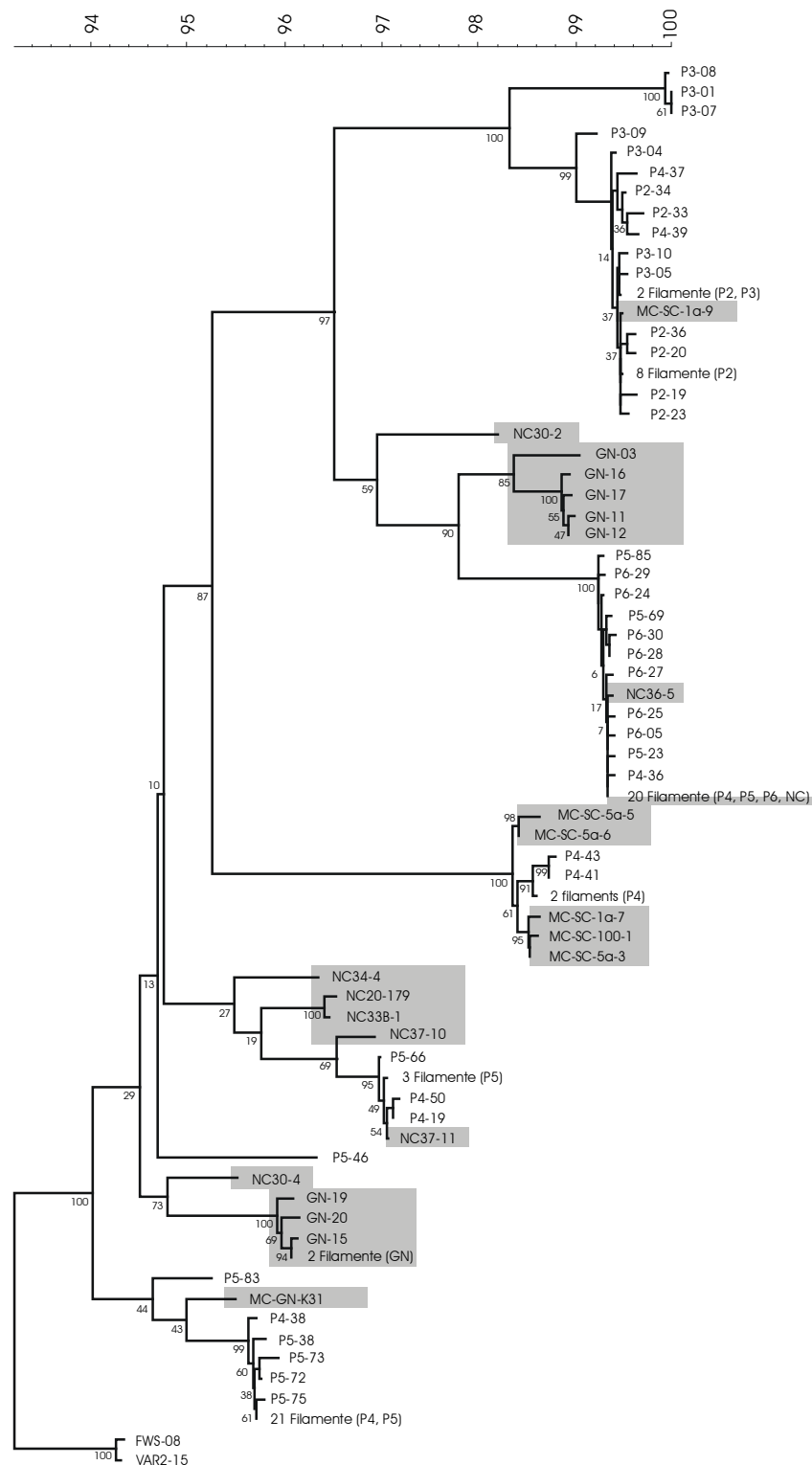
Der ILD-Test zeigte unter Verwendung einer Sequenz jedes Sequenztyps bei allen Kombinationen der Gene einen p-Wert von 0.01. Zwischen den Datensätzen herrschte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p = 0.05$ ) signifikante Inkongruenz. Die geringe statistische Signifikanz der phylogenetischen Bäume wurde auch durch die niedrigen Bootstrap-Werte bestätigt. Diese Werte lassen auf das Vorhandensein von Rekombination auch in dieser Region schließen.

#### **3.3.2.5 Vergleich der Sequenzen von Proben aus dem Pondsysteem und der Umgebung**

Neben der Sequenzierung der 93 Filamente innerhalb des Pondsysteems der Saline wurden zusätzlich neun Filamente aus Mattenproben sequenziert, die innerhalb der Saline aber außerhalb des Pondsysteems gesammelt wurden. Zusätzlich wurden zehn Filamente und eine Kultur aus einer Bucht bei Guerrero Negro sequenziert sowie sechs Kulturen aus San Carlos weiter südlich von Guerrero Negro. Ein phylogenetischer Baum, der aus den verknüpften Sequenzen der drei Gene von allen 119 Filamenten berechnet wurde, ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Proben, die außerhalb des Pondsysteems gesammelt wurden, kamen sowohl in eigenen Clustern als auch zusammen mit den Proben aus dem Pondsysteem vor. Auch wenn es innerhalb der Ponds bei der Gruppenbildung eine klare Abgrenzung zwischen den Proben aus den einzelnen Ponds gab, konnte dies im Zusammenhang mit den Proben außerhalb der Ponds nicht beobachtet werden. Es gab keinen phylogenetischen Cluster, in dem nur Proben aus den Ponds vorkamen.

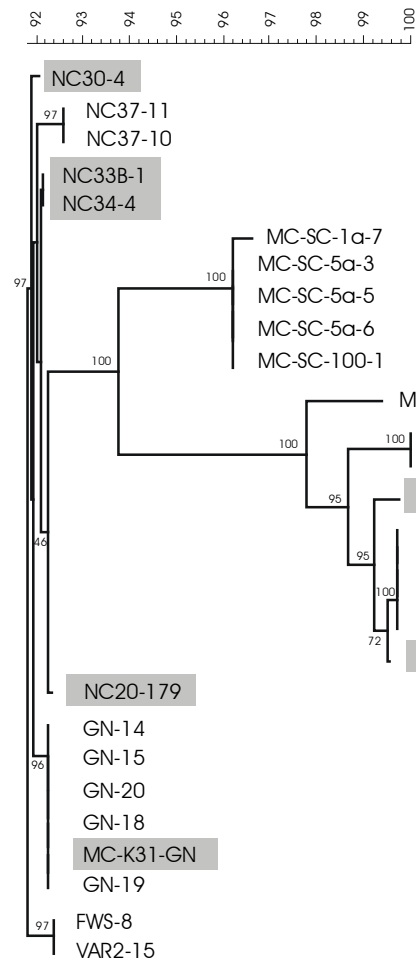
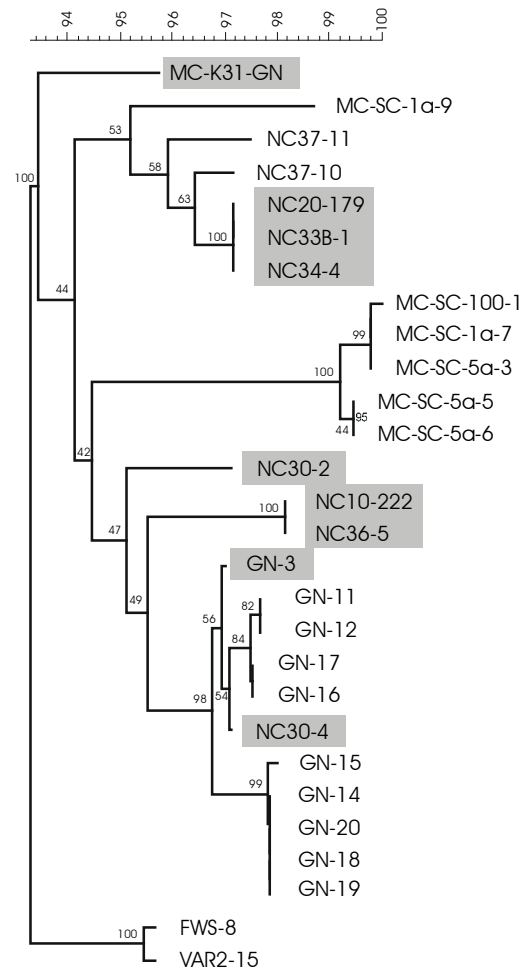
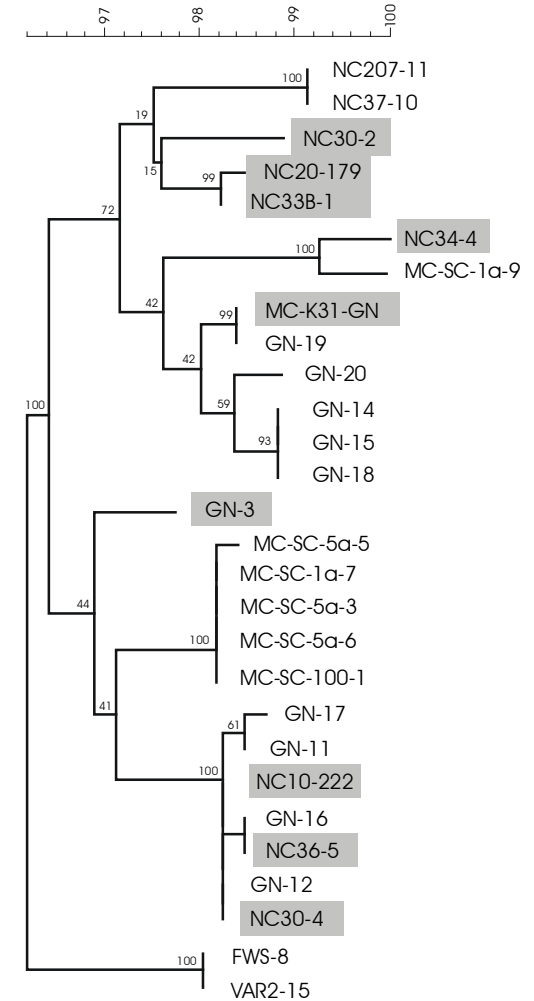
Die phylogenetischen Bäume, die nur mit den Sequenzen der außerhalb des Pondsysteems gesammelten Proben erstellt wurden (Abbildung 18) zeigen untereinander eine wesentlich geringere Kongruenz als die weiter oben beschriebenen Bäume, die mit Sequenzen von den Filamenten aus den Ponds errechnet wurden.





**Abbildung 17:** Phylogenetischer Baum, erstellt aus den verknüpften Sequenzen der Filamente für die drei Genloci. Berechnung nach der Neighbor-Joining-Methode. Für die Berechnung wurde für jeden Sequenztyp nur eine Sequenz verwendet. Die Proben, die außerhalb des Pondsystems gesammelt wurden, sind grau hinterlegt.

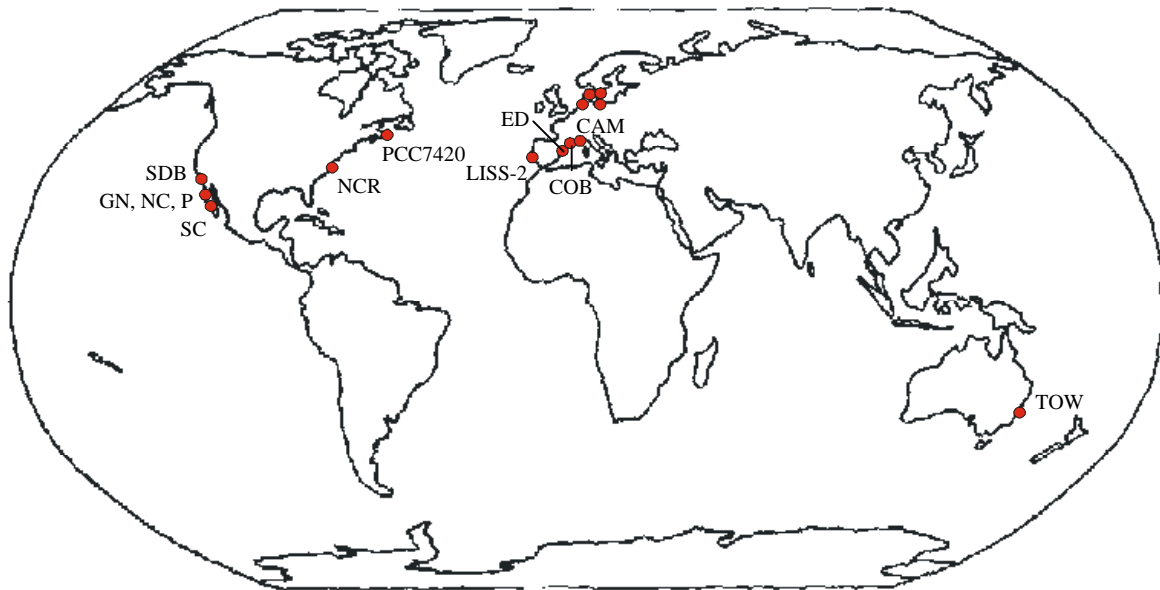
rDNA-ITS

*kaiC**petB/D*

**Abbildung 18:** Phylogenetische Bäume für die Proben außerhalb des Pondsystems. Berechnung nach der Neighbor-Joining-Methode. Grau hinterlegte Filamente befinden sich in den Sequenzbäumen in unterschiedlichen Clustern.

### 3.3.3 Weltweiter Vergleich

Für den weltweiten Vergleich wurden neben den schon erwähnten Proben aus der Nordsee- und Ostsee-Region und aus Baja California, Mexiko, Filamente und Kulturen aus Spanien, Frankreich, Portugal, den USA (Kalifornien, North Carolina, Massachusetts) und Australien untersucht. Detaillierte Angaben können Tabelle 1 (Seite 23 ff.) sowie Abbildung 19 entnommen werden.



**Abbildung 19:** Karte mit den Probensammelorten weltweit (eigene Zeichnung). Genauere Angaben zu den Sammelstandorten der Nordsee- und Ostseeregion können Abbildung 5 entnommen werden.

### Diversität, Biogeographie

Es wurden insgesamt 310 Proben analysiert. Als Außengruppe für die phylogenetischen Bäume wurde ein unidentifiziertes Cyanobakterium, vermutlich *Microcoleus* sp., aus dem Solar Lake, Ägypten verwendet. Die Länge der Sequenzen sowie die Anzahl der variablen Positionen, synonymen und informativen Polymorphismen und die Anzahl der Allele sind in Tabelle 8 dargestellt. Insgesamt konnte eine sehr hohe Sequenzvariabilität, vor allem in der ITS-Region (66 variable Positionen) und in *kaiC* (107 variable Positionen) festgestellt werden. Es konnten 148 Sequenztypen unterschieden werden. Die Anzahl der Allele pro Genlocus variierte zwischen 43 und 80 Allelen, die meisten Allele wurden für *kaiC* entdeckt. Dieser

Genlocus wies auch die höchste Sequenzvariabilität auf. Die Allelprofile aller 310 Proben sind im Anhang (Tabelle 7.1) aufgelistet.

**Tabelle 8: Länge der Sequenz, Anzahl der Allele, synonyme und informativer Polymorphismen für die einzelnen Genloci**

Locus	Länge der Sequenz	Allele	Anzahl variabler Positionen	Anzahl informativer Positionen
rDNA-ITS	509	64	88	79
16S rDNA	296		22	16
ITS	213		66	63
<i>kaiC</i>	466	80	107 / 100 <sup>a</sup>	102 / 97 <sup>a</sup>
<i>petB/D</i>	348	43	47	45
<i>petB</i>	296		32 / 30 <sup>a</sup>	30 / 28 <sup>a</sup>
<i>pet</i> -IGS	52		15	15

<sup>a</sup> synonyme Positionen

Die Variabilität in den Nukleotidsequenzen war hauptsächlich zwischen den einzelnen phylogenetischen Clustern und weniger innerhalb der Cluster zu beobachten. In Abbildung 20 sind die drei Allelbäume für die Genloci dargestellt. Aufgrund der Übersichtlichkeit sind hier die Allelbäume abgebildet. Die Allelprofile aller Proben sind im Anhang als Tabelle aufgelistet.

**Abbildung 20** (folgende Seiten): Phylogenetische Bäume für alle drei Genloci. Die Berechnung erfolgte mit der Neighbor-Joining Methode. Für die Berechnung wurde für jedes Allel nur eine Sequenz verwendet. Die Nummern in den Klammern geben die Anzahl der identischen Filamente an. Stammten die Filamente aus mehreren Gebieten, wurde die Anzahl identischer Filamente für jedes Gebiet gesondert angegeben.

## rDNA-ITS

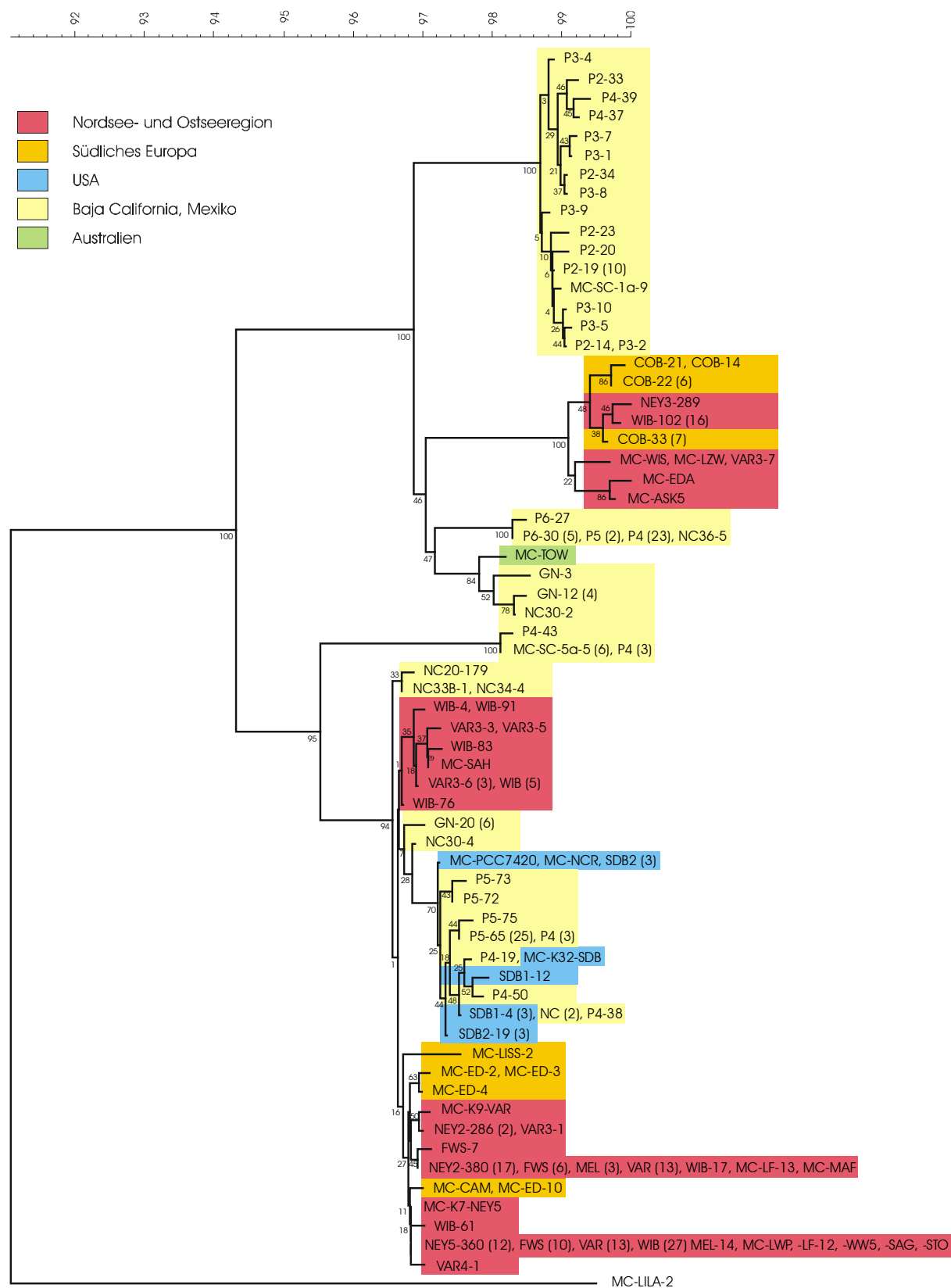


Abbildung 20

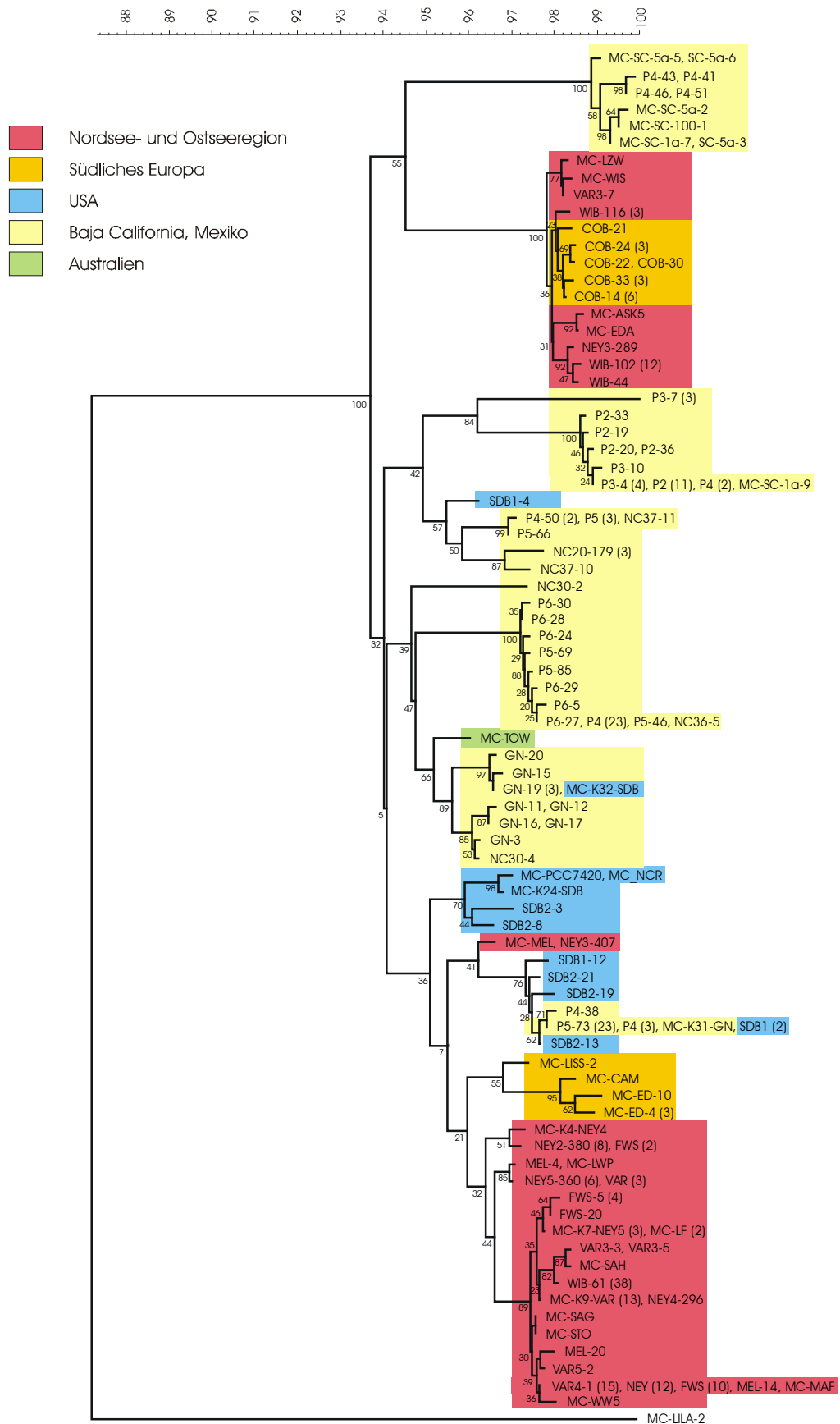
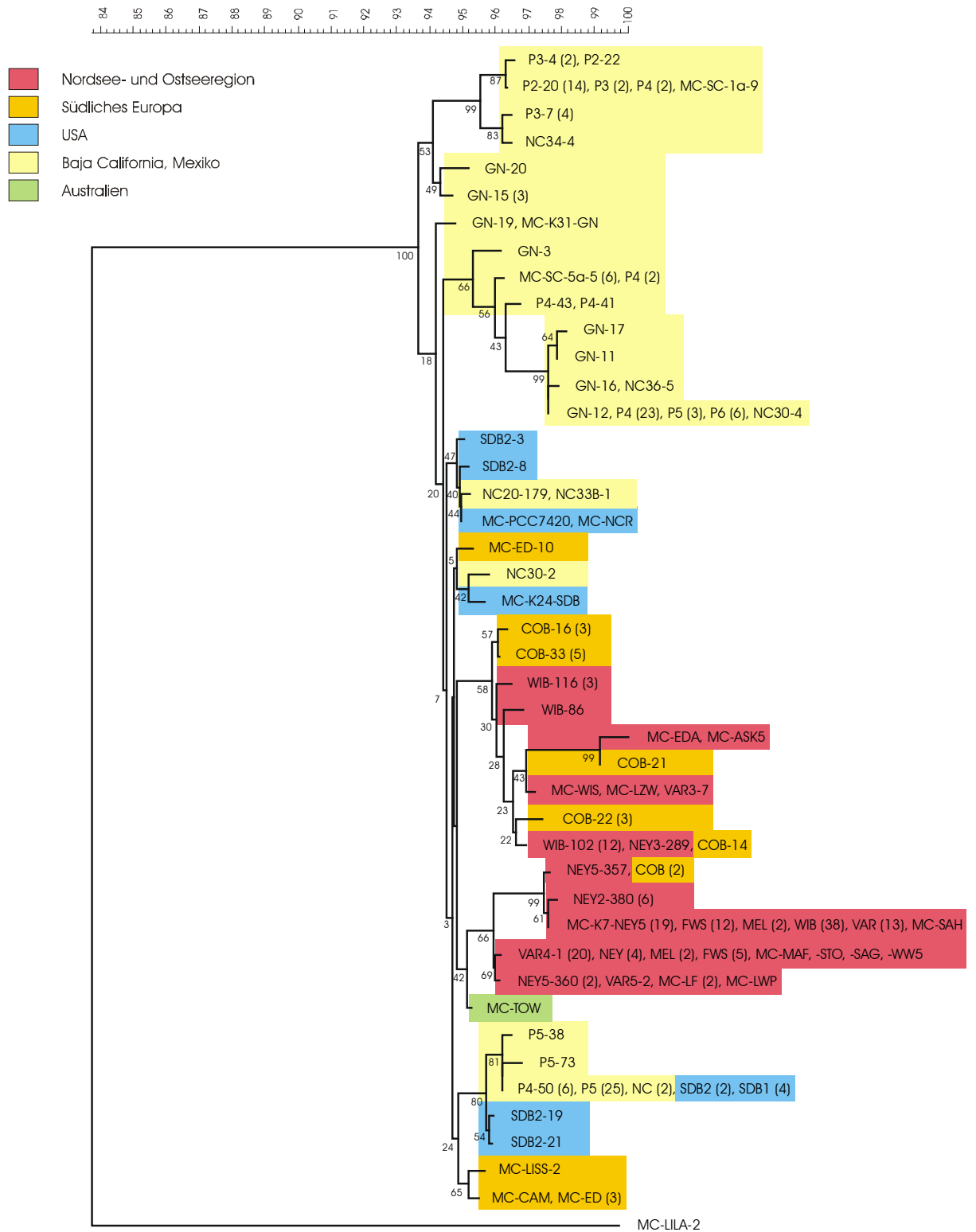
*kaiC*

Abbildung 20 (Fortsetzung)

***petB/D*****Abbildung 20 (Fortsetzung)**

In fast allen Fällen bildeten Proben aus den größeren geographischen Regionen eigene Cluster. Filamente und Kulturen aus Mexiko und den USA waren am nächsten miteinander verwandt, ebenso wie Filamente und Kulturen aus Europa eigene Cluster bildeten. Die aus Costa Brava, Spanien, stammenden Filamente fielen in eine Gruppe mit den Filamenten aus der Nordsee- und Ostsee-Region, die sich deutlich von den anderen Filamenten aus der Nordsee- und Ostsee-Region unterschieden (Cluster NO-VIII, siehe 4.3.1). Die Kulturen aus Spanien, Frankreich und Portugal bildeten in den *kaiC*- und rDNA-ITS-Bäumen mit den übrigen Proben aus der Nordsee- und Ostsee-Region eine Gruppe. Allerdings gab es auch Ausnahmen von den eben beschriebenen Beobachtungen. So waren die Kulturen aus Spanien, Frankreich und Portugal im *petB/D*-Baum am nächsten mit den Proben aus Mexiko und den USA verwandt. Die Kultur aus Australien war in den Bäumen der rDNA-ITS Region und *kaiC* am nächsten mit den Proben aus Mexiko und den USA verwandt, während sie innerhalb des *petB/D*-Baumes in die Cluster der Nordsee- und Ostsee-Region fiel.

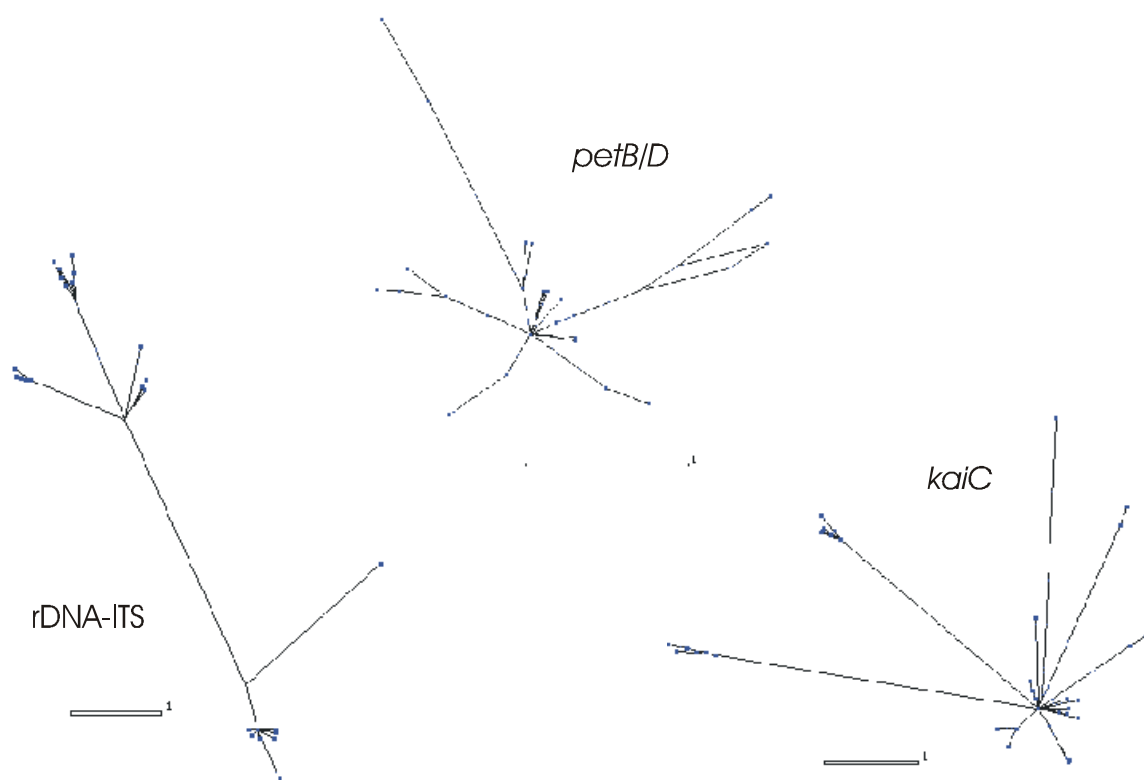
Die Sequenzen zeigten, dass die Proben aus dem Costa Brava-, Nordsee- und Ostsee-Cluster sowohl im rDNA-ITS-Baum als auch im *kaiC*-Baum näher mit den Proben aus Mexiko und den USA verwandt waren als mit den anderen Proben aus Europa, auch wenn sie einen eigenständigen Cluster bildeten. Im *petB/D*-Baum befand sich dieser Cluster allerdings in der Nähe der anderen europäischen Cluster und nicht bei den Proben aus Mexiko und den USA. Der *petB/D*-Baum wich damit in mehrfacher Hinsicht von den anderen beiden Genbäumen ab (vgl. Abbildung 20). Im *kaiC*-Baum fielen zwei Proben aus der Nordsee-Region (NEY3-407 und die Kultur MC-MEL) in einen Cluster mit Proben aus Mexiko und den USA. Allerdings unterschieden sie sich innerhalb des Clusters von den anderen Proben; die Sequenzen waren mit keiner der Sequenzen der in Amerika gesammelten Proben identisch.

### Rekombination

Der Assoziationsindex aller 310 Proben lag bei 0.825 mit signifikantem Koppelungsungleichgewicht. Während teilweise innerhalb einzelner Regionen nahezu vollständiges Koppelungsgleichgewicht oder zumindest niedrige Assoziationsindizes ohne signifikantes Koppelungsungleichgewicht erkennbar waren,



kam es anscheinend zwischen den geographischen Regionen zu so gut wie keinem Genaustausch. Dies ist auch in den Gen-Bäumen erkennbar. Der Austausch von Filamenten zwischen Clustern beschränkte sich fast ausschließlich auf Cluster aus der gleichen Region. Ausnahmen bildeten die Kultur aus Australien, sowie die Kulturen aus Frankreich, Portugal und zwei Proben aus der Nordsee-Region (siehe weiter vorne). Auch die Splitstrees ließen keine Anzeichen für Rekombination innerhalb der Gene erkennen (Abbildung 21). Die Splitstrees zeigten keinerlei Netzwerkstrukturen zwischen den Clustern oder geographischen Regionen. Für das Erkennen von Netzwerken innerhalb einzelner Cluster oder Regionen ist die Auflösung dieser Splitstrees allerdings zu gering. Detaillierte Splitstrees einzelner Regionen sind in den vorherigen Kapiteln ersichtlich.



**Abbildung 21:** Splitstrees für alle untersuchten Filamente.

## 4 Diskussion

### 4.1 Eignung der kulturunabhängigen Sequenzierung für die MLSA

Die Multilocus Sequenzanalyse (MLSA) wurde ursprünglich in der Form des Multilocus Sequence Typing für pathogene Mikroorganismen entwickelt und bis jetzt vor allem für Pathogene und wirtschaftlich relevante Organismen angewendet. Fast alle Studien haben für die Analysen axenische Kulturen verwendet. Möchte man MLSA an freilebenden Bakterien anwenden, ergeben sich aus der ausschließlichen Verwendung von Kulturen einige Nachteile. Besonders für langsam wachsende Mikroorganismen wie *M. chthonoplastes* ist das Kultivieren im Labor sehr zeitaufwändig. Das Anwachsen der Filamente von *M. chthonoplastes* ist im Durchschnitt erst nach zwei bis drei Monaten ersichtlich. Oftmals überlebt auch nur ein kleiner Teil der Zellen oder Filamente den Übergang in Kultur. Die anwachsenden Stämme sind möglicherweise nicht repräsentativ für die ursprünglich in der Probe vorkommenden Individuen, da Organismen gefördert werden, die bevorzugt unter Laborbedingungen wachsen können (Barker et al., 2000; Ward et al., 1998; Embley und Stackebrandt, 1997).

Beim kulturunabhängigen Ansatz können dagegen wesentlich größere Datensätze erzeugt werden, die die zugrundeliegende Population bestmöglich repräsentieren und damit wesentlich besser dazu geeignet sind, grundlegende Fragen über Diversität, Verbreitung oder auch von evolutionären Prozessen zu beantworten. Das ist besonders für nicht-pathogene oder wirtschaftlich nicht relevante Mikroorganismen von Vorteil, da große Kultursammlungen für diese Organismen oftmals fehlen.

Inzwischen gibt es einige populationsgenetische Untersuchungen an Cyanobakterien, auch mittels Vergleich mehrerer Genloci und protein-kodierender Gene (z. B. Tanabe et al., 2004; Manen und Falquet, 2002; Rudi et al., 1998). Die meisten dieser Analysen wurden allerdings mit Kulturen durchgeführt. Kulturunabhängige Ansätze wie am Beispiel von *Nodularia* von Barker et al. (2000) beschrieben, beschränkten sich bisher auf Methoden mit geringerer Auflösung wie die Allel-spezifische PCR. Unterschiede in den schon bekannten Sequenzen dreier Genloci wurden von Barker et al. genutzt, um mit Hilfe spezifischer Primer eine große Anzahl an Filamenten den einzelnen Allelen zuzuordnen. Auf diese Weise lassen

sich wesentlich größere Anzahlen an Filamenten vergleichen. Allerdings besteht die Gefahr, dass viele, noch unbekannte Allele dabei nicht entdeckt werden und die tatsächliche Diversität unterschätzt wird. MLSA dagegen hat ein hohes Maß an Diskriminierung. Ein einziges Nukleotid Unterschied in einer Sequenz führt zur Zuordnung zu einem neuen Allel. Dieser Ansatz eignet sich daher ausgezeichnet für Untersuchungen der innerartlichen Diversität.

*M. chthonoplastes* eignet sich für das kulturunabhängige MLSA besonders gut, da die Filamente aufgrund ihrer Größe und auffälligen Morphologie leicht zu erkennen und zu handhaben sind. Da ein Filament aus einer Vielzahl identischer Zellen besteht, ist die Wahrscheinlichkeit größer, ausreichend Zell-Material für die PCR-Amplifikation zur Verfügung zu haben. Aufgrund der wesentlich größeren Anzahl an Filamenten, die auf diese Weise sequenziert werden können, eignet sich diese Methode bei einem Cyanobakterium wie *M. chthonoplastes* daher hervorragend zur Untersuchung größerer Stichproben.

Die Amplifikation der Filamente an den drei ausgewählten Genloci zeigte sowohl für frisches Mattenmaterial als auch für eingefrorenes Material sehr gute Resultate, wenn die Filamente innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Aufarbeitung amplifiziert wurden. Primer für andere Genloci, wie dem Phycocyanin-Locus (*cpc*) und RubisCO (*rbc*), die für andere Cyanobakterien erfolgreich verwendet wurden, waren bei der Amplifikation von *M. chthonoplastes* Filamenten nicht erfolgreich (Nübel, unveröffentlicht).

Ein Nachteil der Methode ist allerdings, dass sie sich nicht ohne weiteres auf andere Arten übertragen lässt. Mit großer Wahrscheinlichkeit funktioniert sie aber für weitere filamentöse Cyanobakterien sowie andere große Mikroorganismen.

## **4.2 Diversität und Biogeographie von *M. chthonoplastes***

Im Folgenden wird auf die einzelnen Fragen näher eingegangen, die eingangs in dieser Arbeit aufgestellt wurden (siehe 2.6) und die mit Hilfe der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse diskutiert werden. Dieses Kapitel behandelt die Diversität

und Biogeographie von *M. chthonoplastes*, während sich die nächsten Kapitel mit Rekombination und dem Artenkonzept befassen.

### Diversität

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine große, vormals unentdeckte Sequenzdiversität von *M. chthonoplastes* hin. Es wurden weltweit 43 bis 80 unterschiedliche Sequenzen für die einzelnen Genloci gefunden, bei einer Stichprobe von 310 Filamenten und Kulturen. Bezogen auf die Allelprofile wurden 148 Sequenztypen entdeckt; im Durchschnitt wurde also jedem zweiten Individuum eine einzigartige Sequenzkombination an den drei Genloci zugeordnet. Allerdings gab es sowohl Sequenzen als auch Sequenztypen die sehr häufig vorkamen, während eine große Anzahl an Sequenzen und Sequenztypen nur ein einziges Mal auftauchten. Diese Variabilität spiegelte sich auch in den Sequenzen selbst wieder. Es wurden bis zu 107 variable Positionen (*kaiC*) für die einzelnen Genloci beobachtet. Die Polymorphismen traten vor allem in der ITS und an den synonymen Positionen der protein-kodierenden Gene auf und hatten damit vermutlich keinen Einfluss auf den Phänotyp oder den Ablauf der biochemischen Prozesse innerhalb der Zellen. Diese hochvariablen Regionen wurden bisher für *M. chthonoplastes* nicht untersucht und erhöhen die Erkenntnisse über die innerartliche Diversität im Vergleich zum 16S rRNA Gen. Bisherige Analysen des 16S rRNA Gens deuteten auf eine hohe Sequenzähnlichkeit hin. Garcia-Pichel et al. (1996) untersuchten das 16S rRNA Gen von vier Stämmen, die aus Baja California (Mexiko), Massachusetts (USA), dem Ebro-Delta (Spanien) und von der Nordseeinsel Mellum (Deutschland) stammten. Das 16S rRNA Gen der vier Kulturen zeigte nur ein einziges variables Nukleotid (A bzw. T an Position 629) innerhalb der kompletten Sequenz. Auch eine DGGE-Analyse von mehreren *M. chthonoplastes* Kulturen und Feldproben zeigte identisches Schmelzverhalten aller DNA-Fragmente. Die Autoren schlossen daraus, dass nur eine Sequenz bzw. fast identische Sequenzen innerhalb dieser Art vorkommen und *M. chthonoplastes* damit ein kosmopolitisches Bakterium ist.

Auch die in dieser Arbeit untersuchten Filamente und Kulturen wiesen in dem 16S rRNA Gen identische beziehungsweise sich stark ähnelnde Sequenzen auf. Im Vergleich zu dem in der Literatur als *M. chthonoplastes* identifizierten Stamm PCC 7420 gab es Sequenzunterschiede von null bis acht Nukleotiden in dem

sequenzierten Teilabschnitt des 16S rRNA Gens. Wie von anderen Autoren bereits beschrieben, ist die Sequenzdiversität des 16S rRNA Gens für innerartliche Vergleiche daher nur bedingt geeignet. Stattdessen sollten sich schneller entwickelnde Regionen, wie zum Beispiel protein-kodierende Gene, verwendet werden (Ward et al., 1998; Palys et al., 1997). Die Sequenzierung eines Teils des 16S rRNA Gens diente in dieser Arbeit vor allem dazu, die Filamente, von denen keine Kulturen vorhanden waren, mit dem Referenzstamm PCC 7420 zu vergleichen, auch wenn auffällige Abweichungen aufgrund der Spezifität der Primer nicht zu erwarten waren. Die in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen der Kulturen ähnelten denen der Filamente und waren teilweise identisch. Die Kulturen waren somit repräsentativ für die zugrundeliegenden Populationen. Allerdings konnte aufgrund der geringen Anzahl an Kulturen dadurch auch nur ein Teil der hohen Diversität entdeckt werden, die durch die hier vorliegenden Untersuchungen offensichtlich wurde.

### **Biogeographie**

Unterschiede auf lokaler, regionaler und globaler Ebene lassen sich bedingt feststellen. Auf lokaler Ebene waren keine eindeutigen Sequenzunterschiede zwischen Individuen verschiedener, nah beieinander liegender Standorte erkennbar, wenn die Standortbedingungen sich glichen oder ähnelten. Sowohl auf Norderney als auch an der schwedischen Küste bei Varberg wurden innerhalb von Entfernungen von weniger als 100 m bis zu 5 km Proben gesammelt (NEY1 bis NEY5; VAR2 bis VAR5). Bis auf wenige Ausnahmen (z.B. der Cluster mit VAR3-3, VAR3-5) konnte keine Korrelation zwischen geographischer und genetischer Distanz festgestellt werden. Die relative Nähe der Standorte bedingte eine hohe Wahrscheinlichkeit der Durchmischung von Filamenten unterschiedlicher Standorte durch die Meeresströmungen. Auf der anderen Seite gab es Standorte, wie in der Wismarer Bucht, wo Individuen mit hoher genetischer Diversität nebeneinander vorkamen und zwischen denen es anscheinend auch nicht zum Austausch genetischen Materials kam. Möglicherweise stellt dieser Standort unterschiedliche Mikrohabitate mit mehreren ökologischen Nischen zur Verfügung.

Gugger et al. (2005) haben die genetische Diversität von *Cylindrospermopsis*, eines Cyanobakteriums, untersucht. Die ITS-Sequenzen von Kulturen von vier Kontinenten

(Amerika, Europa, Afrika und Australien) wurden miteinander verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Kulturen in drei Cluster, abhängig von dem geographischen Herkunftsort, aufteilten. Kulturen, die vom gleichen Kontinent stammten, waren näher miteinander verwandt als Kulturen von verschiedenen Kontinenten. Kulturen aus Amerika und Europa bildeten jeweils eigene Cluster während Kulturen aus Australien und Afrika eine gemeinsame Gruppe bildeten. Diese Arbeit zeigt, dass geographische Isolation auf großflächiger Ebene auch bei weltweit vorkommenden Arten eine Rolle spielt.

Ähnliches konnte auch für die Gruppierung von *M. chthonoplastes* in Bezug auf die geographische Lage beobachtet werden, wenn auch nicht immer eindeutig und nicht immer uneingeschränkt nach Kontinenten getrennt. Europäische Proben bildeten so gut wie immer eigene Cluster, genau wie die amerikanischen Proben. Das gemeinsame Vorkommen von Sequenzen südkalifornischer Filamente mit Sequenzen von Filamenten aus Baja California kann durch die pazifischen Meeresströmungen erklärt werden, die entlang der Küste je nach Jahreszeit die Richtung wechseln. Im Sommer ist die Meeresströmung vor Kalifornien und Baja California von Nord nach Süd gerichtet, im Winter größtenteils von Süd nach Nord. Ebenso lässt sich die Durchmischung der genetisch diversen Filamente in der Nordsee- und Ostsee-Region durch Meeresströmungen erklären (Abbildung 5). Interessanterweise fielen die Sequenzen der spanischen Costa Brava Proben sowie einiger Proben aus der Nordsee- und Ostsee-Region für die Genloci rDNA-ITS und *kaiC* phylogenetisch in die Nähe der mexikanischen Proben, anstatt mit den übrigen europäischen Proben eine Gruppe zu bilden. Es scheinen daher noch andere Parameter als allein die Möglichkeit der Verbreitung der Organismen durch die Meeresströmungen für die genetische Diversität auf globaler Ebene eine Rolle zu spielen.

Da auf globaler Ebene durchaus Sequenzen von *M. chthonoplastes* Filamenten einer geographischen Region in einem phylogenetischen Cluster mit Filamenten anderer Regionen vorkommen (siehe z. B. die Kultur MC-TOW aus Australien), scheint geographische Isolation an Standorten mit ähnlichen Wachstumsbedingungen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Papke et al. (2003) argumentieren, dass nach der Hypothese von Baas-Becking, „alles ist überall“, in verschiedenen geographischen Regionen gleiche Sequenzen vorkommen würden, vor allem im 16S rRNA Gen. Ähnliches wird von Staley und Gosink (1999) beschrieben. Kosmopolitische Bakterien dürften daher keine geographischen Cluster bilden. Diese Aussagen treffen in großen Teilen für das 16S rRNA Gen der sequenzierten *M. chthonoplastes* Filamenten zu. Es konnte eine hohe phylogenetische Kohärenz zwischen geographisch getrennten Populationen entdeckt werden. Von den variablen Genloci kann dies jedoch nicht gesagt werden. Auch wenn *M. chthonoplastes* in der Literatur als kosmopolitisch bezeichnet wird, ist die verallgemeinernde Aussage „alles ist überall“ so nicht haltbar, da durchaus Sequenzunterschiede zwischen Filamenten unterschiedlicher geographischer Regionen beobachtet werden konnten. Allerdings ist es möglich, dass diese Unterschiede auf unterschiedliche Standortbedingungen wie Salzgehalt oder Temperatur zurückzuführen sind. Da der Austausch von genetischem Material zwischen sich dicht beieinander befindlichen Individuen eher zustande kommen kann als zwischen weiter entfernten Populationen, sind Sequenzunterschiede auf regionaler und globaler Ebene auch für weltweit vorkommende, rekombinierende Arten zu erwarten. Das zeitlich begrenzte, lokale Auftreten von einigen dominanten Klonen kann ebenso zu dem Eindruck führen, dass diese Art eine geographische Strukturierung aufweist (Fenchel, 2003).

### **Ökologische Standortbedingungen**

Anders stellt es sich dar, wenn Individuen nicht auf geographischer Ebene sondern an Standorten mit unterschiedlichen Standortbedingungen verglichen werden. *M. chthonoplastes* gehört zu den halotoleranten Arten (Golubic, 1980). In dieser Arbeit wurden Filamente untersucht, die aus Gebieten mit Salinitäten von 0.5% (südliche Ostsee) bis 15% (Saline in Guerrero Negro, Baja California) stammen. *M. chthonoplastes* ist in der Lage, sich diesen unterschiedlichen Salinitäten anzupassen und kann daher sowohl in Matten in Salinen als auch in eher brackigen Gewässern wie der Ostsee vorkommen. Karsten (1996) bezeichnet *M. chthonoplastes* daher als euryhalines Cyanobakterium, als einen Organismus also, der in einem breiten Spektrum an Salinitäten überleben kann und diese auch physiologisch toleriert. Physiologische Untersuchungen zum Wachstum von *M. chthonoplastes* in verschiedenen Salinitäten und zu den Wachstumsoptima von Kulturen

unterschiedlicher Herkunft weltweit zeigen, dass die individuellen Optima sowie Salztoleranzen mit den Orten korrelieren, von denen die Stämme isoliert wurden (Karsten, 1996). Kulturen, die aus hypersalinen Umgebungen isoliert wurden, zeigten Wachstumsoptima bei höheren Salinitäten als Isolate aus brackigem Wasser mit geringer Salinität. Allerdings sind auch Individuen aus hypersalinen Standorten in der Lage, bei den geringeren Salzgehalten von Meerwasser (3.2 – 3.5 %) zu wachsen (Nübel, unveröffentlicht). In der Saline in Baja California konnte an *M. chthonoplastes* beobachtet werden, dass Filamente, die entlang des Salinitätsgradienten in den Ponds gesammelt und anschließend analysiert wurden, unterschiedliche Allelprofile aufwiesen. Die einzelnen Individuen scheinen sich den Salinitäten angepasst zu haben und unterschiedliche Optima ausgebildet zu haben, in denen sie wachsen können. Ob einzelne Individuen unter isolierten Bedingungen auch in wesentlich geringeren oder höheren als in den Ponds gemessenen Salzgehalten wachsen können, konnte nicht untersucht werden, da keine Kulturen aus der Saline isoliert werden konnten. Es ist aber möglich, dass Populationen, die bei einem bestimmten Salzgehalt ihr Optimum haben, Populationen mit anderen Optima aus diesem Bereich verdrängen, auch wenn diese ohne Konkurrenz dort ebenfalls wachsen könnten. Da im Gegensatz dazu eine Kultur im besten Fall nur aus Klonen besteht, ist es möglich, dass diese auch in für sie weniger optimalen Bedingungen wachsen. Für ökologische Untersuchungen ist daher immer auch das Zusammenspiel unterschiedlicher Individuen, Populationen oder sogar Arten zu berücksichtigen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

### **4.3 Rekombination**

Bei dem Vorgang der Rekombination kann genetisches Material mittels Transformation, Transduktion oder Konjugation von einem Individuum in ein anderes Individuum gelangen. Die Fähigkeit des Genaustausches erschwert phylogenetische und evolutionsbiologische Vergleiche, da von der genetischen Ausstattung eines Organismus nicht mehr ohne weiteres auf seinen Vorfahren geschlossen werden kann. Untersuchungen, inwieweit eine Art durch Rekombination beeinflusst wird, sind daher wichtig, um Rückschlüsse auf Verwandtschaftsgrade und Diversität von Arten ziehen zu können.



### **Rekombination am Beispiel der Nordsee- und Ostsee-Region**

In dieser Arbeit wurde das mögliche Auftreten von Rekombination durch den Vergleich phylogenetischer Bäume an drei Genloci, durch das Erstellen von Splittrees sowie durch statistische Berechnungen mittels des Assoziationsindex und dem ILD-Test ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass in Populationen von *M. chthonoplastes* innerhalb einzelner geographischer Regionen mit ähnlichen Umweltparametern Rekombination häufig vorkommen kann. Für den Nordsee- und Ostseebereich wurde für einen Großteil der Proben Rekombination entdeckt. Obwohl nur eine begrenzte Anzahl an Allelen jedem Genlocus zugeordnet werden konnte (9-26 Allele), wurde eine wesentlich größere Anzahl an Sequenztypen entdeckt (56 ST). Rekombination führt zu einer zufälligen Kombination der Allele und damit zu einer größeren Anzahl an Sequenztypen als in einer klonalen Population erwartet werden würde, in der die Allele miteinander gekoppelt weitergegeben werden.

Ein weiteres Indiz für Rekombination ist die Inkongruenz der phylogenetischen Bäume für die einzelnen Genloci. Jeder der für die drei Gene erstellten Bäume hatte eine etwas andere Entwicklungsgeschichte, was auf unterschiedliche Entwicklungsgeschichten der untersuchten Gene innerhalb der einzelnen Individuen schließen lässt. Einzelne Filamente befanden sich somit in unterschiedlichen Clustern und erschwerten damit die genaue Zuordnung der Verwandtschaftsbeziehungen. Ein phylogenetischer Baum, der auf der Grundlage eines einzelnen Gens erstellt wird, gibt in diesem Fall nur die Beziehungen der Allele an diesem Genlocus wieder und kann nicht für Aussagen über die Entwicklungsgeschichte der Organismen als solche herangezogen werden (Spratt, 2004; Feil et al., 2001). Auch innerhalb der einzelnen Genbäume gab es eine teilweise nur geringe statistische Unterstützung des jeweils dargestellten Baumes, ersichtlich aus den geringen Bootstrap-Werten (vgl. Abbildung 9). Diese Nonkongruenz kann zum Beispiel aufgrund von Rekombinationsereignissen innerhalb der Gene verursacht werden. In diesem Fall würden zum Beispiel Splittrees die Verwandtschaftsverhältnisse besser darstellen als phylogenetische Bäume.

Mit Hilfe des ILD-Tests wurde untersucht, inwieweit sich Bäume, die mit zwei oder mehreren unterschiedlichen Datensätzen erstellt wurden, in diesem Fall die Sequenzen der unterschiedlichen Genloci, ähneln. Für die Cluster NO-I bis NO-VII ergaben sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $\alpha = 0.05$ ) für alle möglichen Kombinationen Werte von  $p < 0.05$ . Das heißt, dass mit den Datensätzen signifikant unterschiedliche Bäume berechnet wurden. Rekombination kann eine Erklärung für die unterschiedliche Entwicklungsgeschichte der Gene sein.

Einzelne Segmente der Sequenzen können durch Rekombination eine unterschiedliche Entwicklungsgeschichte aufweisen und zu widersprüchlichen Signalen bei der Berechnung der Bäume führen. Bei der split decomposition Analyse werden widersprüchliche Signale berücksichtigt, indem ineinander verflochtene Netzwerke erstellt werden. Bei der Berücksichtigung aller Proben aus dieser Region waren für die rDNA-ITS Region und für *kaiC* keine deutlichen Netzwerke zu erkennen. Nur *petB/D* zeigte deutliche Netzwerkstrukturen. Da in den Untersuchungen zwischen Cluster NO-VIII und den übrigen Clustern nur sehr wenig Genaustausch entdeckt werden konnte und das Einbringen aller Proben die Auflösung innerhalb der Gruppen verringerte, wurden Splittrees auch gesondert für Cluster NO-I bis NO-VII einerseits und Cluster NO-VIII andererseits erstellt. Sowohl die Clustergruppe NO-I bis NO-VII als auch Cluster NO-VIII zeigten deutliche Netzwerkstrukturen, die auf intragenetische Rekombination schließen ließen (einzige Ausnahme: *petB/D* bei Gruppe 1).

Diese Ergebnisse wurden auch durch den Assoziationsindex bestätigt. Wurden alle Proben aus der Region einbezogen, ergab sich ein Assoziationsindex von 0.429 mit signifikantem Koppelungsungleichgewicht. Wird bei den Berechnungen in der Nordsee- und Ostseeregion dagegen der Cluster NO-VIII nicht mit einbezogen, ergibt der Assoziationsindex für die restlichen 81 Proben  $I_A = 0.224$ . Für die einzelnen Standorte war er teilweise noch niedriger:  $I_A$  NEY = 0.156,  $I_A$  FWS = -0.003. Diese Werte gehören mit zu den niedrigsten Assoziationsindizes, die in Prokaryoten bis jetzt gefunden wurden. Für eine Population des panmiktischen Bakteriums *Neisseria gonorrhoeae* wurde ein Assoziationsindex von  $I_A = 0.04$  errechnet (Maynard Smith et al., 1993), für *Porphyromonas gingivalis* wurde ein Index von  $I_A = 0.09$  berechnet (Koehler et al., 2003). Diese Daten lassen vermuten, dass die in der Nordsee- und

Ostsee-Region untersuchte Population eine panmiktische Populationsstruktur mit annäherndem Koppelungsgleichgewicht aufweist.

Rekombination in Cyanobakterien in der Ostsee-Region wurde auch schon von Barker et al. (2000) für *Nodularia* festgestellt. Die Autoren haben mittels Allel-spezifischer PCR dreier Genloci über 2000 Filamente dieser Art untersucht und einen Assoziationsindex von  $I_A = 0.203$  berechnet. Daraus schlossen die Autoren, dass Rekombination in *Nodularia* vorkommt, allerdings nicht häufig genug, um ein vollständiges Koppelungsgleichgewicht herzustellen. Es ist allerdings zu beachten, dass der Index auch durch die Methode beeinflusst worden sein kann, da durch die Allel-spezifische PCR möglicherweise nicht die gesamte Sequenzdiversität innerhalb der untersuchten Gene entdeckt worden ist.

Der hohe Assoziationsindex für sämtliche Nordsee- und Ostsee-Proben deutet darauf hin, dass in dieser Region zwei Populationen vorkommen, zwischen denen Rekombination selten ist, auch wenn sie zumindest in einer der beiden Populationen häufig vorkommt. Etwas Ähnliches wurden von Maynard Smith (1995) für das symbiotische Bakterium *Rhizobium meliloti* beschrieben. Der untersuchte Datensatz besteht aus Sequenzen von zwei Populationen innerhalb derer Rekombination häufig vorkommt, zwischen den zwei Populationen dagegen selten ist. Würde der Assoziationsindex für die Art als Ganzes berechnet, ergäbe sich eine klonale Populationsstruktur, auch wenn Rekombination häufig vorkommt.

Der hohe Assoziationsindex innerhalb des Cluster NO-VIII kann möglicherweise auf die geringe Variabilität und die im Vergleich zur Gesamtzahl niedrige Stichprobengröße innerhalb dieses Clusters zurückgeführt werden. Von den 153 untersuchten Sequenzen gehören nur 21 Sequenzen dem Cluster NO-VIII an. Von diesen 21 Sequenzen sind 11 Sequenzen in allen drei Bäumen identisch. Möglicherweise zeigt sich hier eine epidemische Struktur mit einem einzelnen Sequenztyp, der sich vorübergehend erfolgreich ausgebreitet hat.

### **Rekombination beeinflussende Parameter**

Bei dem Vergleich der phylogenetischen Bäume aller 310 analysierten Proben zeigt sich mit wenigen Ausnahmen eine Clusterbildung in Abhängigkeit des geographischen Standortes der untersuchten Filamente. Diese Beobachtung spiegelt

sich auch in dem Vorhandensein von Rekombination wieder. Während Rekombination in einzelnen Regionen häufig ist (zum Beispiel in der Nordsee- und Ostsee-Region), konnte zwischen den einzelnen Regionen kaum Rekombination entdeckt werden. Der Assoziationsindex war hoch ( $I_A = 0.827$ ) mit signifikantem Koppelungsungleichgewicht der Allele. Die geographische Trennung einzelner Populationen scheint demnach auch die Fähigkeit des Austausches von Gensegmenten zu verhindern. Dieser Zusammenhang wird bei der Betrachtung der Mechanismen, die zu Rekombination führen, deutlich. Auch wenn nur bei der Konjugation direkter Zell-zu-Zell Kontakt notwendig ist, sind auch die Verbreitung genetischen Materials durch Phagen und die Aufnahme von DNA aus der Umgebung bis zu einem gewissen Grade ortsabhängig. Die Wahrscheinlichkeit eines Rekombinationsereignisses nimmt daher mit zunehmender geographischer Entfernung ab.

Homologe Rekombination ist abhängig von der Sequenzähnlichkeit von Organismen. Es wird daher davon ausgegangen, dass Rekombination mit zunehmender Sequenzdiversität abnimmt (Brown et al. 2003; Spratt und Maiden 1999; Vulic et al. 1999). Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass Rekombination auch bei relativ hoher Sequenzdiversität noch vorkommt. Maynard Smith (1995) erwähnt Rekombination zwischen Arten mit bis zu 23% Unterschieden in der Nukleotidsequenz, Feil und Spratt (2001) beschreiben Unterschiede von bis zu 25 – 30%. Auf der anderen Seite haben Roberts und Cohan (1993) gezeigt, dass bei *Bacillus subtilis* die Fähigkeit zum Austausch von Genen fast vollständig von der Sequenzdiversität zwischen Donor und Empfänger abhängt. Es ist daher möglich, dass neben der geographischen Entfernung auch die genetische Distanz zwischen den Clustern eine Rolle spielt. Das wird besonders bei der Betrachtung einzelner Regionen deutlich. In der Nordsee- und Ostsee-Region zum Beispiel gibt es zwei Hauptgruppen, die vermutlich zwei Populationen darstellen und die eine hohe Sequenzdiversität zwischen einander zeigen. Diese Diversität kann ein Grund dafür sein, dass zwischen den beiden Gruppen keine Rekombination entdeckt werden konnte, obwohl sie von gleichen Standorten stammen.

### **Mechanismen des Genaustausches in Cyanobakterien**

Über die Mechanismen der Rekombination in Cyanobakterien ist nicht viel bekannt. Die Aufnahme freier DNA durch natürliche Transformation wurde für *Synechococcus* von Lorenz und Wackernagel (1994) beschrieben, für *Synechocystis* von Barten und Lill (1995). In jüngerer Zeit wurde verstärkt die Möglichkeit des Genaustausches mittels Cyanophagen untersucht. Clokie et al. (2003) zeigten in ihrer Arbeit, dass das Cyanobakterium *Synechococcus* durch Cyanophagen infiziert werden kann, und dass die Phagen einen Teil der Cyanobakterien-DNA in ihre eigene DNA einbauen können. Auf diese Weise ist eine Transportmöglichkeit zum nächsten Wirt und damit die Möglichkeit der Rekombination gegeben. Sullivan et al. (2003) haben Cyanophagen aus *Prochlorococcus* isoliert. Während einige der Phagen spezifisch für ihren jeweiligen Wirt waren, konnten andere Phagen *Prochlorococcus*-Isolate infizieren, die an unterschiedliche Lichtverhältnisse angepasst waren, sowie auch die nah verwandte Art *Synechococcus*. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Genaustausch mittels Cyanophagen zumindest bei einigen Cyanobakterien-Arten eine wichtige Rolle spielt.

Ob Cyanophagen in *M. chthonoplastes* vorkommen ist nicht bekannt. Es wurden allerdings Cyanophagen-ähnliche Partikel in einer *Microcoleus* sp. Kultur, die aus einem Süßwasserhabitat isoliert wurde, beobachtet (Rosowski et al., 1999). Für *M. chthonoplastes* gibt es bis jetzt keine Untersuchungen über die der Rekombination zugrundeliegenden Mechanismen. Sowohl die für Cyanobakterien beschriebenen Mechanismen der Transformation als auch der Transduktion durch Cyanophagen könnten bei der Übertragung genetischen Materials in *M. chthonoplastes* eine Rolle spielen. Detaillierte Untersuchungen sind nötig, um genauere Aussagen machen zu können.

## **4.4 Artendiskussion**

Für Prokaryoten gibt es bis heute kein eindeutiges, universell anwendbares Artenkonzept. Das biologische Artenkonzept nach Mayr (1944, 1963), welches besagt, dass eine Art eine Gruppe von sich wirklich oder potenziell fortpflanzenden natürlichen Populationen ist, die sich reproduktiv von anderen solchen Gruppen isolieren, kann nicht ohne weiteres auf Prokaryoten angewendet werden. Das

Konzept dient zur Einteilung sexueller Arten. Rekombination in Bakterien ist dagegen ein eher seltener Vorgang, die Rekombinationsrate übersteigt oftmals nicht die Rate der Mutation. Nur bei panmiktischen Arten wie *Neisseria gonorrhoeae* sind höhere Rekombinationsraten beobachtet worden, die aber immer noch deutlich unter denen sich sexuell fortpflanzender Eukaryoten liegen (Cohan, 2002a). Auf der anderen Seite ist Rekombination bei Bakterien nicht immer auf Individuen einer Art beschränkt. Genetisches Material wird auch zwischen Individuen ausgetauscht, die verschiedenen Arten angehören (Cohan, 2002a). Allerdings wird davon ausgegangen, dass die Rekombinationsrate von Individuen innerhalb einer Art höher ist als von Individuen unterschiedlicher Arten, da homologe Rekombination identische Sequenzabschnitte voraussetzt und diese innerhalb von Individuen einer Art mit höherer Wahrscheinlichkeit auftreten (Brown et al., 2003; Vulic et al., 1999). Anstelle eines allgemeingültigen Konzepts gibt es eine Vielzahl von Definitionen, die versuchen, dem Begriff ‚Art‘ bei Prokaryoten gerecht zu werden. Ein genereller Ansatz zur Unterscheidung von Arten bei Prokaryoten definiert eine Art als eine Gruppe von Stämmen, die einen hohen Grad an Ähnlichkeit besitzen und sich deutlich in mehreren unabhängigen Merkmalen von anderen Gruppen von Stämmen unterscheiden (Colwell et al., 1995). Prokaryoten werden dementsprechend nicht auf der Grundlage einer allgemeingültigen Theorie sondern mittels empirisch erlangter Erfahrungswerte in Arten unterteilt (Gevers et al., 2005; Rosselló-Mora und Amann, 2001; Wayne et al., 1987). Seit der Einführung molekularbiologischer Techniken in die Mikrobiologie gehören die DNA-DNA Hybridisierung und die Analyse des 16S rRNA Gens zu den Standardmethoden der Artabgrenzung (Stackebrandt und Goebel, 1994). Bei Isolaten, die mehr als 70% Ähnlichkeit bei der DNA-DNA Hybridisierung und weniger als 5% Unterschied in ihrer Schmelztemperatur zeigen, wird gegenwärtig davon ausgegangen, dass sie zur gleichen Art gehören. Zeigen sie weniger als 50% Ähnlichkeit bei der DNA-DNA Hybridisierung, gehören sie unterschiedlichen Arten an (Gevers et al., 2005; Rosselló-Mora und Amann, 2001). Untersuchungen haben gezeigt, dass Organismen, die 70% und mehr Ähnlichkeit bei der DNA-DNA Hybridisierung zeigen, mehr als 97% Sequenzidentität im 16S rRNA Gen besitzen (Stackebrandt und Goebel, 1994).

Arten werden heutzutage mittels eines polyphasischen Ansatzes eingeteilt. Es werden sowohl der Phänotyp als auch der Genotyp untersucht und Arten auf

Grundlage einer Vielzahl an Kriterien voneinander abgegrenzt. Kritiker der Einteilung der Arten nach phänotypischen und genotypischen Kriterien bemängeln den statischen und willkürlichen Ansatz dieser Methode. Nicht immer ist der Typstamm, der Namensträger, mit seiner speziellen phänotypischen und genotypischen Ausprägung „typisch“ für alle Organismen dieser Art. Ökologische und evolutionsbiologische Faktoren werden in dieser Definition nicht berücksichtigt (Gevers et al., 2005; Ward, 1998; Istock et al., 1996). Rosselló-Mora und Amann (2001) betonen dagegen, dass dieses Konzept zur Unterteilung von prokaryotischen Arten praktikabel, stabil, operativ und voraussagbar ist und sich damit zur Einteilung von Arten bewährt hat.

Ein weiteres Problem bei der heutigen Artabgrenzung ist, dass sich Artendefinitionen bei Bakterien größtenteils auf Erfahrungswerte stützen, die vor allem von gut zu untersuchenden Kulturen gewonnen werden konnten. Nur auf Grundlage dieser Kulturen kann oftmals wenig über ihre Relation zu den genetisch verwandten natürlichen Populationen und zu den Habitaten dieser Populationen gesagt werden (Istock et al., 1999). Frei lebende Bakterien sind wesentlich schwerer voneinander abzugrenzen. Aber auch hier scheint es zur natürlichen Gruppierung von Stämmen zu kommen (Rodríguez-Valera, 2002). Neuere Artenkonzepte, die auch natürliche Populationen von Bakterien berücksichtigen, gehören vor allem zwei Kategorien an: sie betrachten Arten entweder auf Grundlage ihres Vorkommens in ökologischen Nischen oder aufgrund von Rekombinationsraten innerhalb und zwischen einzelnen Gruppen (Rodríguez-Valera, 2002). Sie finden jedoch noch keine praktische Anwendung.

### **Ökologische Artenkonzepte**

Mikroorganismen der gleichen ökologischen Nische verlieren ihre Diversität untereinander, indem ein erfolgreicher Klon alle anderen Klone innerhalb der ökologischen Nische verdrängt, ein Prozess, der periodische Selektion genannt wird. Rekombination tritt innerhalb von bakteriellen Populationen nicht häufig genug auf, um diesen Effekt zu verhindern (Cohan, 2004; Cohan 2002b). Individuen anderer ökologischer Nischen sind nicht von der gleichen Selektion betroffen. Populationen einer ökologischen Nische werden in diesem Zusammenhang auch Ökotypen genannt. Ökotypen bilden also in sich geschlossene genetische Einheiten, die sich

ökologisch von anderen Ökotypen unterscheiden, was allerdings oft nicht untersucht wird. Die Entstehung eines neuen Ökotyps ist nur möglich, wenn er eine neue ökologische Nische für sich beansprucht. Jeder Ökotyp repräsentiert eine eigene Abstammungslinie mit eigener Entwicklungsgeschichte (Cohan, 2002b).

Diese Eigenschaften eines Ökotyps ähneln den Charakteristika von Arten, weshalb Cohan (2002b) den Vorschlag macht, Arten als evolutionäre Abstammungslinien zu betrachten, die durch Ökotyp-spezifische periodische Selektion miteinander verbunden sind. Cohan stützt sich dabei auf Artenkonzepte, wie das „Cohesion Species Concept“ (Templeton, 1989; Meglitsch, 1954) oder das „Ecological Species Concept“ (Van Valen, 1976). Cohan (2001) argumentiert, dass nach dem „Cohesion Species Concept“ die periodische Selektion innerhalb von Ökotypen, also der Verlust der genetischen Diversität an allen Loci innerhalb einer Population, durch Kohäsionskräfte beeinflusst wird. Das „Ecological Species Concept“ definiert Arten dagegen als Gruppen, die unterschiedliche ökologische Nischen bewohnen. Jeder Ökotyp kann als eigenständiger Sequenzcluster identifiziert werden. Die durchschnittliche Sequenzdiversität zwischen den Clustern wäre deutlich höher als die Sequenzdiversität innerhalb jedes einzelnen Clusters (Cohan, 2002b). Als Beispiele für die Unterteilung einer Art in mehrere Ökotypen nennt Cohan (2002b) *Neisseria meningitidis* mit 10 identifizierten Ökotypen, *Staphylococcus aureus* mit 26 identifizierten Ökotypen oder *S. pneumoniae* mit 28 identifizierten Ökotypen. Noch nicht ausreichend geklärt ist allerdings die Frage nach der Abgrenzung von Ökotypen: wie unterschiedlich müssen Sequenzcluster sein, damit sie als voneinander abgegrenzte Ökotypen angesehen werden können und wann sind es nur unterschiedliche Gruppen innerhalb eines Ökotyps (Cohan, 2001)?

Um Arten aufgrund ihrer ökologischen Isolation zu definieren ist es daher unabdingbar, dass die Populationen auch im Hinblick auf ihre Ökologie untersucht werden und ihre ökologische Verteilung verstanden wird (Ward et al., 1998).

Das 16S rRNA Gen ist zur Differenzierung von Arten in mehrere Sequenzcluster, die dem Begriff Ökotyp entsprechen könnten, wenig geeignet. Untersuchungen haben gezeigt, dass auch Organismen mit sehr ähnlichen 16S rRNA Genen in unterschiedlichen ökologischen Nischen vorkommen können und damit als unterschiedliche Ökotypen abgegrenzt werden können. Ward et al. (1998) haben 16S rRNA Gen-Sequenztypen von Cyanobakterien aus einer mikrobiellen Matte im



Yellowstone Nationalpark mittels DGGE entlang eines Temperaturgradienten untersucht. Sie haben fünf Populationen feststellen können, die entlang des Temperaturgradienten angeordnet waren. Die Autoren schlossen daraus, dass es sich vermutlich um unterschiedliche Ökotypen handelt und nach den Definitionen von Artenkonzepten wie dem „Ecological Species Concept“ möglicherweise sogar um unterschiedliche Arten. Vorherige morphologische Untersuchungen der Matte haben nur einen einzigen Morphotypen für einzellige Cyanobakterien erkennen lassen (*Synechococcus lividus*). Auffällig dabei war auch, dass die 16S rRNA Gen-Sequenzen teilweise Ähnlichkeiten von über 99% aufwiesen. Während bei weniger als 97% Sequenzidentität zwischen zwei Organismen mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, dass es sich um unterschiedliche Arten handelt, reicht die Untersuchung des 16S rRNA Gens nicht aus, um eine ausreichend hohe Auflösung auf der Ebene der Arten oder innerhalb von Arten zu erhalten (Stackebrandt und Goebel, 1994; Fox et al., 1992).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass *Microcoleus chthonoplastes* eine hohe innerartliche Diversität besitzt, die nur durch Untersuchung des 16S rRNA Gens nicht bemerkt werden konnte. Die Phylogenien der einzelnen Gene zeigten mit wenigen Ausnahmen klare Abgrenzungen zwischen Sequenzclustern. Rekombination konnte in den meisten Fällen nur innerhalb und zwischen nah verwandten Clustern beobachtet werden.

Innerhalb der Nordsee- und Ostsee-Region konnten zwei klar voneinander abgegrenzte Populationen entdeckt werden, zwischen denen keinerlei Genaustausch entdeckt werden konnte (Cluster NO-I bis NO-VII: Population 1; Cluster NO-VIII: Population 2; Abbildung 9). Das 16S rRNA Gen unterscheidet sich zwischen den beiden Populationen um rund 2% (Vergleich zweier Vollsequenzen von je einer repräsentativen Kultur aus beiden Populationen). Morphologische Untersuchungen der Kulturen weisen beide Populationen als *M. chthonoplastes* aus. Die Analyse weiterer Gene hat eine teilweise wesentlich höhere Diversität zwischen den beiden Populationen gezeigt: 21% für die ITS, 8% für *kaiC* und 4% für *petB/D*. Da es nach dem ökologischen Artenkonzept innerhalb von Ökotypen aufgrund der periodischen Selektion nicht zur Ausbildung zweier Cluster kommen kann (Palys et al., 1997), müssen diese beiden Populationen nach dieser Definition unterschiedlichen Ökotypen zugeordnet werden.

Es kann allerdings durchaus auch vorkommen, dass ein Ökotyp an einem Standort eine hohe Diversität aufweist. Eine Erklärung wäre, dass ein besonders erfolgreicher Klon angefangen hat, sich durchzusetzen und die anderen Klone zu verdrängen, aber sich noch nicht vollständig verbreitet hat. Dagegen sprechen allerdings zum einen die hohe Sequenzdiversität zwischen den beiden Populationen, die eine längere Entwicklungsgeschichte vermuten lässt, und zweitens, dass Sequenzen beider Populationen auch außerhalb der Nordsee- und Ostsee-Region zu finden sind, so zum Beispiel an der spanischen, französischen und portugiesischen Küste.

Um festzustellen, ob die beiden Populationen tatsächlich zwei Ökotypen darstellen oder ob andere Gründe für die hohe Diversität vorliegen, ist es unabdingbar, ökologische Analysen durchzuführen. Es ist bis jetzt unklar, welche ökologischen Parameter die Ausbildung der beiden Populationen begünstigt haben, da beide Populationen teilweise von gleichen Standorten stammen. Die Unterschiede müssten auf der Ebene der Mikrohabitate auftreten. Ohne die Kenntnisse der Ökologie können auch keine weiteren Aussagen über die Ausbildung von Ökotypen gemacht werden.

Das 16S rRNA Gen kann nicht zur Unterteilung der Art herangezogen werden, auch wenn die Sequenzdiversität mit 2% relativ hoch ist. Der aufgrund empirischer Untersuchungen gewonnene Schwellenwert von 3% Unterschied in der 16S rRNA Sequenz eignet sich hauptsächlich zur Unterscheidung von Arten und nicht zur Zuordnung von zwei Stämmen zu einer Art (Stackebrandt und Goebel, 1994). Bei Sequenzunterschieden von weniger als 3% kann nicht nur auf Grundlage dieser Ergebnisse auf die Zugehörigkeit der beiden Proben zu einer Art geschlossen werden. Es gibt Arten, die sehr ähnliche 16S rRNA Sequenzen aufweisen, aber aufgrund der DNA-DNA Hybridisierung unterschiedlichen Arten zugeordnet werden können, wie von Fox et al. (1992) am Beispiel *Bacillus globisporus* und *B. psychrophilus* gezeigt. Die Autoren schlagen als Lösung vor, Arten mit identischen 16S rRNA Sequenzen und niedrigen Werten bei der DNA-DNA Hybridisierung als Unterarten einer Art zu betrachten. Es wäre interessant zu erfahren, inwieweit sich die beiden *M. chthonoplastes* Populationen in der Nordsee- und Ostsee-Region bei einer DNA-DNA Hybridisierung unterscheiden. Bei Unterschieden von mehr als 30% könnten in dieser Region zwei Unterarten von *M. chthonoplastes* nebeneinander

vorkommen. Gäbe es dagegen auch in der DNA-DNA Hybridisierung eine hohe Übereinstimmung würde das nur auf eine hohe Sequenzvariabilität dieser Art hindeuten. Diesbezügliche Ergebnisse liegen bis jetzt allerdings nicht vor.

Beim Vergleich der Sequenzen aus dem Nordsee- und Ostseeraum mit den übrigen Sequenzen fällt auf, dass sich der von den anderen Clustern deutlich abgegrenzte Cluster NO-VIII (Population 2) in der Nähe der Sequenzcluster aus Baja California gruppiert. Die Abgrenzung, die innerhalb der Nordsee- und Ostsee-Region so deutlich zu sein scheint, ist im weltweiten Kontext betrachtet nicht mehr so offensichtlich.

Es ist weiterhin fraglich, ob sich die Sequenzen der einzelnen Gene auf Artniveau weit genug voneinander entwickelt haben, um eine weitere Unterteilung dieser Art zu rechtfertigen. Es kann aufgrund der vorhandenen Daten nicht geklärt werden, ob es sich tatsächlich um zwei signifikant voneinander getrennte Populationen oder sogar Unterarten handelt oder nur um verschiedene Ausprägungen innerhalb einer Art.

In der Saline in Baja California konnte die Verteilung der Populationen entlang des Salinitätsgradienten beobachtet werden. Die Abgrenzung der einzelnen Populationen ist hier nicht so deutlich wie in der Nordsee- und Ostsee-Region, wird aber erkennbar durch den Salzgehalt der Umgebung beeinflusst. Die Frage ist auch hier, ob sich die Populationen deutlich genug voneinander abgrenzen, um dem von Cohan und anderen Autoren definierten Begriff Ökotyp gerecht zu werden. Es lässt sich zumindest vermuten, dass die Populationen an die unterschiedlichen Salinitäten angepasst sind und somit verschiedene ökologische Nischen einnehmen. Es konnte allerdings zwischen den Clustern durchaus auch Rekombination entdeckt werden, die Populationen sind daher genetisch nicht vollständig voneinander isoliert.

### **Konzepte, die Rekombination und multiple Genloci berücksichtigen**

Neben den Konzepten, die die Ökologie in den Mittelpunkt stellen, gibt es eine Reihe von Modellen die auf der Rate des Genaustausches zwischen Individuen innerhalb und zwischen verschiedenen Populationen oder klonaler Komplexe basieren. Untersuchungen dieser Art wurden vor allem durch die Entwicklung des multilocus sequence typings und der Multilocus Sequenzanalyse vorangetrieben (Rodríguez-Valera, 2002). Die Methode des MLSA hat gezeigt, dass innerhalb einzelner Arten

mehrere Sequenzcluster auftreten können, die sich teilweise deutlich voneinander unterscheiden und die durch die Analyse des 16S rRNA Gens nicht entdeckt werden konnten. Das mögliche Vorhandensein von Rekombination kann mittels MLSA-Datensätzen festgestellt werden, zum Beispiel durch Inkongruenzen zwischen den einzelnen Genbäumen oder durch die Bestimmung des Assoziationsindex. Dykhuizen und Green (1991) argumentieren, dass phylogenetische Bäume verschiedener Genloci bei Mitgliedern einer rekombinierenden Art aufgrund des Genaustausches unterschiedlich sein sollten, während Phylogenien verschiedener Genloci bei Mitgliedern unterschiedlicher Arten gleich bleiben sollten. Es wird davon ausgegangen, dass zwischen Individuen einzelner Cluster Rekombination häufiger auftritt als zwischen Individuen verschiedener Cluster. Wenn zwischen einzelnen Clustern keinerlei Rekombination auftritt, besteht die Möglichkeit, dass diese Cluster ein Ausmaß an Isolation erreicht haben, das die Unterscheidung in verschiedene Arten gerechtfertigt (Lan und Reeves, 2001). Nach dieser Definition könnten die beiden in dieser Arbeit untersuchten Populationen von *M. chthonoplastes* in der Nordsee- und Ostsee-Region nicht nur als Untergruppen einer Art sondern sogar als unterschiedliche Arten angesehen werden: Während zumindest in der einen Population Rekombination häufig vorkommt (Population 1), konnte zwischen den beiden Populationen keinerlei Rekombination entdeckt werden. Allerdings konnte auch in einer der beiden Populationen (Population 2) nur sehr wenig Rekombination nachgewiesen werden, so dass mit der vorhandenen Stichprobe allein auf dieser Grundlage keine sichere Aussage getroffen werden kann. Auch spielen neben Rekombination noch viele weitere Faktoren eine Rolle, so dass Rekombination nicht als alleiniges Merkmal zur taxonomischen Untergliederung herangezogen werden sollte.

### **Die Bedeutung von MLSA in Artenkonzepten**

Um Arten auf der Grundlage von Sequenzanalysen zu beschreiben, werden Gene benötigt, die in der Lage sind, innerartliche Diversität zu erkennen. Das 16S rRNA Gen ist dazu nur bedingt geeignet, da es zu konservativ ist. Es werden außerdem mehrere Gene für die Analyse benötigt, um aufgrund von möglicher Rekombination keine falschen Schlüsse in Bezug auf Verwandtschaftsverhältnisse zu ziehen (Gevers et al., 2005).

Das Problem bei der Anwendung von MLSA (genauso wie von MLST) zur Definition von Arten liegt bei der Definition von geeigneten Genen. Die Auswahl der Gene, die für die Sequenzanalyse geeignet sind, kann für Mitglieder höherer Taxa unterschiedlich sein, so dass neben den für die Epidemiologie erprobten Genen noch weitere Gene und Genkombinationen für andere Arten benötigt werden könnten. Nicht alle Gene sind für alle Gattungen oder Familien nützlich oder überhaupt vorhanden (Gevers et al., 2005). Ein weiteres Problem kann die Entwicklung von universellen Primern darstellen, die für eine große Anzahl an Taxa gleichermaßen anwendbar sind (Richert et al., 2005; Santos und Ochman, 2004).

In dieser Arbeit wurden neben der rDNA-ITS Region die Haushaltsgene *kaiC* und *petB/D* für die Sequenzierung ausgewählt. Für *M. chthonoplastes* eignet sich besonders *kaiC* für die MLSA, da es eine sehr hohe Diversität aufweist. Die Diversität von *petB/D* ist im Vergleich dazu geringer, aber immer noch groß genug für populationsgenetische Analysen. Allerdings können sowohl *kaiC* als auch *petB/D* nicht für alle Bakterien verwendet werden. *kaiC* findet sich nur in Bakterien mit tageszeitlichem Rhythmus, während *petB/D* zum Photosyntheseapparat gehört und daher auch nur in bestimmten Taxa zu finden ist. Für die Unterscheidung bei Cyanobakterien sind dagegen beide Gene eine gute Alternative bzw. Ergänzung für die von Epidemiologen verwendeten Gene.

Die untersuchten Individuen von *Microcoleus chthonoplastes* spalten sich in mehrere, teilweise voneinander distinkte Cluster auf. Die Diversität innerhalb dieser Art wurde allein aufgrund der Sequenzierung mehrerer Gene entdeckt, phänotypische Analysen zeigen entweder keine Unterschiede zwischen den Gruppen oder stehen noch aus. Aufgrund der genetischen Diversität innerhalb der Art besteht die Möglichkeit, dass *M. chthonoplastes* aus Untergruppen besteht, die nur entfernt genetisch verwandt sind. In der Literatur wird der Begriff „genomovar“ für die Unterscheidung dieser Gruppen vorgeschlagen (Rosselló-Mora und Amann, 2001). Eine einzelne Art kann nach diesem Konzept aus mehreren genetisch distinkten Gruppen bestehen, ohne dass eine Differenzierung in mehrere Arten nötig ist. Das Problem dabei besteht darin, herauszufinden, wie unterschiedlich Sequenzcluster voneinander sein müssen, um Klassifizierungen auf der Ebene der Art und innerhalb von Arten vornehmen zu können. Das betrifft nicht nur die Unterscheidung einzelner genomovars sondern zum Beispiel auch die Unterteilung

einer Art in mehrere Ökotypen auf der Grundlage von Sequenzanalysen (Cohan, 2001).

Molekulare Techniken wie MLST und MLSA eignen sich sehr gut um Organismen auf und unterhalb der Artenebene zu untersuchen. Die hohe Auflösung, die mit Haushaltsgenen erreicht wird, ermöglicht eine Subklassifizierung vieler Arten, die mit den klassischen Methoden so nicht möglich war.

Trotz der Vorzüge, die die Multilocus Sequenzanalyse mit sich bringt, ist für die Unterscheidung von Arten bis heute ein polyphasischer Ansatz nötig, der neben der Sequenzierung eine Vielzahl weiterer genotypischer, phylogenetischer und phänotypischer Analysen berücksichtigt.

Auch wenn die Unterscheidung von Arten durch die Multilocus Sequenzanalyse eine interessante Alternative zu den bestehen Artendefinitionen ist, darf nicht vergessen werden, dass die unterschiedlichen Rekombinationsraten bei Bakterien zur Ausbildung unterschiedlicher populationsgenetischer Strukturen führen, von klonal bis panmiktisch. Es wäre daher möglich, dass auch mehrere unterschiedliche Artenkonzepte für die Beschreibung der ‚Art‘ als solche nötig sind (Stackebrandt, 2004).

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden mittels eines kulturunabhängigen Ansatzes einzelne, aus verschiedenen Regionen der Erde stammende Filamente des marinen, benthischen Cyanobakteriums *Microcoleus chthonoplastes* sequenziert und analysiert. Es wurden insgesamt 258 Filamente an drei Genloci (rDNA-ITS, *kaiC* und *petB/D*) analysiert sowie zusätzlich 52 Kulturen. Neben einem weltweiten Vergleich wurden eine größere Anzahl an Filamenten aus der Nordsee- und Ostsee-Region sowie einer Saline in Baja California, Mexiko näher untersucht.

Durch die hier vorliegenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass *M. chthonoplastes* eine hohe, vormals unentdeckte, innerartliche Variabilität auf genetischer Ebene aufweist. Die Haushaltsgene *petB/D* und vor allem *kaiC* sowie die ITS-Region eigneten sich sehr gut für Sequenzanalysen bei *M. chthonoplastes*, da die Gene eine hohe Diversität aufweisen. Die hier verwendete Methode der Multilocus Sequenzanalyse ist somit sehr gut geeignet, um innerartliche Variabilität auf genetischer Ebene festzustellen.

Auch wenn *M. chthonoplastes* weltweit vorkommt, konnten Unterschiede in der Sequenzzusammensetzung auf globaler Ebene beobachtet werden. Phylogenetische Bäume, die aus den Sequenzen der einzelnen Gene berechnet wurden, ließen mit wenigen Ausnahmen eine Gruppierung der Organismen hinsichtlich der geographischen Lage ihres Herkunftsorts erkennen. Auf lokaler und teilweise auch auf regionaler Ebene konnte dagegen keine statistisch signifikante Gruppierung hinsichtlich der geographischen Lage erkannt werden, obwohl auch hier eine hohe Sequenzdiversität festgestellt werden konnte.

In der Saline in Baja California wurden die Proben entlang eines Salinitätsgradienten gesammelt. Die Sequenzanalyse und Berechnung phylogenetischer Bäume ergab die Unterteilung der Proben in vier Gruppen in Abhängigkeit ihres Fundortes. Es konnte eine Anordnung der Proben entlang des Salinitätsgradienten beobachtet werden. Während die Proben aus den niedrigen und den hohen Salinitäten klar voneinander abgegrenzt waren, konnten die Proben aus dem mittleren Salinitätsbereich in mehreren der Gruppen wiedergefunden werden.

Rekombination konnte für *M. chthonoplastes* in einzelnen geographischen Regionen festgestellt werden. Vor allem die Ergebnisse für die Proben der Nordsee- und Ostsee-Region ließen auf das Vorhandensein von Rekombination innerhalb dieser Art schließen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Bandelt, H.-J. und A. W. M. Dress** (1992). Split decomposition: A new and useful approach to phylogenetic analysis of distance data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **1**: 242-252.
- Barker, G. L. A., Handley, B. A., Vacharapiyasophon, P., Stevens, J. R. und P. K. Hayes** (2000). Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (Cyanobacteria) filaments in the Baltic Sea. *Microbiology* **146**: 2865-2875.
- Barker, G. L. A., Hayes, P. K., O'Mahony, S. L., Vacharapiyasophon, P. und A. E. Walsby** (1999). A molecular and phenotypic analysis of *Nodularia* (Cyanobacteria) from the Baltic Sea. *Phycology* **35**: 931-937.
- Barten, R. und H. Lill** (1995). DNA-uptake in the naturally competent cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters* **129**: 83-88.
- Boyer, S. L., Flechtner, V. R. und J. R. Johansen** (2001). Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1057-1069.
- Boyer, S. L., Johansen, J. R. und V. R. Flechtner** (2002). Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. *Journal of Phycology* **38**: 1222-1235.
- Britschgi, T. B. und S. J. Giovannoni** (1991). Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 1707-1713.
- Brown, E. W., Kotewicz, M. L. und T. A. Cebula** (2002). Detection of recombination among *Salmonella enterica* strains using the incongruence length difference test. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **24**: 102-120.
- Brown, E. W., Mammel, M. K., LeClerc, J. E. und T. A. Cebula** (2003). Limited boundaries for extensive horizontal gene transfer among *Salmonella* pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **100**: 15676-15681.



- Burns, B. P., Goh, F., Allen, M. und B. A. Neilan** (2004). Microbial diversity of extant stromatolites in the hypersaline marine environment of Shark Bay, Australia. *Environmental Microbiology* **6**: 1096-1101.
- Castenholz, R. W.** (1996). Endemism and biodiversity of thermophilic cyanobacteria. *Nova Hedwigia, Beiheft* **112**: 33-47.
- Clokier, M. R. J., Millard, A. D., Wilson, W. H. und N. H. Mann** (2003). Encapsulation of host DNA by bacteriophages infecting marine *Synechococcus* strains. *FEMS Microbiology Ecology* **46**: 349-352.
- Cohan, F. M.** (2001). Bacterial species and speciation. *Systematic Biology* **50**: 513-524.
- Cohan, F. M.** (2002a). Sexual isolation and speciation in bacteria. *Genetica* **116**: 359-370.
- Cohan, F. M.** (2002b). What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology* **56**: 457-487.
- Cohan, F. M.** (2004). Concepts of bacterial biodiversity for the age of genomics. In: **Fraser, C. M., Read, T. D. und K. E. Nelson (Hrsg)**. Microbial genomes. Humana Press, New Jersey, S. 175-194.
- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M., Garrity, G. M. und J. M. Tiedje** (2005). The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* **33**, Database issue: 294-296.
- Colwell, R. R., Clayton, R. A., Ortiz-Conde, B. A., Jacobs, D. und E. Russek-Cohen** (1995). The microbial species concept and biodiversity. In: **Allsopp, D., Colwell, R. R. und D. L. Hawksworth (Hrsg)**. Microbial Diversity and Ecosystem Function. CAB INTERNATIONAL, Cambridge, S. 3-15.
- Cooper, J. E. und E. J. Feil** (2004). Multilocus sequence typing - what is resolved? *Trends in Microbiology* **12**: 373-377.
- Cunningham, C. W.** (1997). Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Molecular Biology and Evolution* **14**: 733-740.
- D'Amelio, E. D., Cohen, Y. und D. J. Des Marais** (1987). Association of a new type of gliding, filamentous, purple phototrophic bacterium inside bundles of *Microcoleus chthonoplastes* in hypersaline cyanobacterial mats. *Archives of Microbiology* **147**: 213-220.

- D'Amelio, E. D., Cohen, Y. und D. J. Des Marais** (1989). Comparative functional ultrastructure of two hypersaline submerged cyanobacterial mats: Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico, and Solar Lake, Sinai, Egypt. In: **Cohen, Y. und E. Rosenberg (Hrsg)**. Microbial Mats. Physiological ecology of benthic microbial communities. American Society for Microbiology, Washington D. C., S. 97-113.
- Des Marais, D. J.** (1995). The biogeochemistry of hypersaline microbial mats. In: **Jones, J. G. (Hrsg)**. Advances in Microbial Ecology. Plenum Press, New York, Band 14, S. 251-274.
- Dykhuisen, D. E. und L. Green** (1991). Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. *Journal of Bacteriology* **173**: 7257-7268.
- Embley, T. M. und E. Stackebrandt** (1997). Species in practice: exploring uncultured prokaryote diversity in natural samples. In: **Claridge, M. F., Dawah, H. A. und M. R. Wilson (Hrsg)**. Species: the units of biodiversity. Chapman and Hall, London, S. 1-15.
- Enright, M. C. und B. G. Spratt** (1999). Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology* **7**: 482-487.
- Feil, E. J., Holmes, E. C., Bessen, D. E., Chan, M. S., Day, N. P. J., Enright, M. C., Goldstein, R., Hood, D. W., Kalia, A., Moore, C. E., Zhou, J. und B. G. Spratt** (2001). Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: Short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **98**: 182-187.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. und B. G. Spratt** (2004). eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* **186**: 1518-1530.
- Feil, E. J. und B. G. Spratt** (2001). Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annual Review of Microbiology* **55**: 561-590.
- Fenchel, T.** (2003). Biogeography for bacteria. *Science* **301**: 925-926.
- Ferris, M. J., Kühl, M., Wieland, A. und D. M. Ward** (2003). Cyanobacterial ecotypes in different optical microenvironments of a 68°C hot spring mat community revealed by 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region variation. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2893-2898.

- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. und P. Jurtshuk Jr.** (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**: 166-170.
- Fulthorpe, R. R., Rhodes, A. N. und J. M. Tiedje** (1998). High levels of endemism of 3-chlorobenzoate-degrading soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1620-1627.
- Garcia-Pichel, F., Prufert-Bebout, L. und G. Muyzer** (1996). Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3284-3291.
- Gerdes, G., Krumbein, W. E. und H.-E. Reineck** (1985). Verbreitung und aktuogeologische Bedeutung mariner mikrobieller Matten im Gezeitenbereich der Nordsee. *Facies* **12**: 75-96.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F. L. und J. Swings** (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 733-739.
- Golubic, S.** (1980). Halophily and halotolerance in cyanophytes. *Origins of life* **10**: 169-183.
- Graur, D. and W.-H. Li** (2000). Fundamentals of molecular evolution. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Guerrero, R., Piqueras, M. und M. Berlanga** (2002). Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *International Microbiology* **5**: 177-188.
- Guerrero, R., Urmeneta, J. und G. Rampone** (1993). Distribution of types of microbial mats at the Ebro Delta, Spain. *BioSystems* **31**: 135-144.
- Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C. und J.-F. Humbert** (2005). Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(2): 1097-1100.
- Hansen, A.** (2001). Bioinformatik. Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler. Birkhäuser Verlag, Berlin.
- Haubold, B. and R. R. Hudson** (2000). LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* **16**: 847-848.
- Huson, D. H.** (1998). SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* **14**: 68-73.

- Huson, D. H. und D. Bryant:** Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 254-267.
- Ishida, T., Yokota, A. und J. Sugiyama** (1997). Phylogenetic relationships of filamentous cyanobacterial taxa inferred from 16S rRNA sequence divergence. *Journal of General and Applied Microbiology* **43**: 237-241.
- Ishiura, M., Kutsuna, S. , Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C. R., Tanabe, A., Golden, S. S., Johnson, C. H. und T. Kondo** (1998). Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* **281**: 1519-1523.
- Istock, C. A., Bell, J. A., Ferguson, N. und N. L. Istock** (1996). Bacterial species and evolution: theoretical and practical perspectives. *Journal of Industrial Microbiology* **17**: 137-150.
- Iteman, I., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N. und M. Herdman** (2000). Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology* **146**: 1275-1286.
- Javor, B. J.** (1983). Nutrients and ecology of the Western Salt and Exportadora de Sal saltern brines. *Sixth International Symposium on Salt* **1**: 195-205.
- Javor, B. J. und R. W. Castenholz** (1981). Laminated microbial mats, Laguna Guerrero Negro, Mexico. *Geomicrobiology Journal* **2**: 237-273.
- Jolley, K. A., Feil, E. J., Chan, M.-S. und M. C. J. Maiden** (2001). Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* **17**: 1230-1231.
- Karsten, U.** (1996). Growth and organic osmolytes of geographically different isolates of *Microcoleus chthonoplastes* (cyanobacteria) from benthic microbial mats: response to salinity change. *Journal of Phycology* **32**: 501-506.
- Karsten, U. und M. Kühl** (1996). Die Mikrobenmatte - das kleinste Ökosystem der Welt. *Biologie in unserer Zeit* **26**: 16-26.
- Koehler, A., Karch, H., Beikler, T., Flemmig, T. F., Suerbaum, S. und H. Schmidt** (2003). Multilocus sequence analysis of *Porphyromonas gingivalis* indicates frequent recombination. *Microbiology* **149**: 2407-2415.
- Kück, U. (Hrsg)** (2005). Praktikum der Molekulargenetik. Springer-Verlag, Heidelberg.

- Lan, R. und P. R. Reeves** (2001). When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. *Trends in Microbiology* **9**: 419-424.
- Leser, H.** (Hrsg) (1997). DIERCKE-Wörterbuch Allgemeine Geographie. Deutscher Taschenbuchverlag, München und Westermann Schulbuchverlag, Braunschweig.
- Lorenz, M. G. und W. Wackernagel** (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews* **58**: 563-602.
- Lorne, J., Scheffer, J., Lee, A., Painter, M. und V. P. W. Miao** (2000). Genes controlling circadian rhythm are widely distributed in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters* **189**: 129-133.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. und Brock, T. D.** (2003). Brock Biology of Microorganisms. International Edition. Pearson Education, Inc., New Jersey.
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E. J., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. und B. G. Spratt** (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **95**: 3140-3145.
- Manen, J.-F. und J. Falquet** (2002). The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 861-867.
- Mann, N. H.** (2003). Phages of the marine cyanobacterial picophytoplankton. *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 17-34.
- Maynard Smith, J.** (1995). Do bacteria have population genetics? In: **Baumberg, S., Young, J. P. W., Wellington, E. M. H. und J. R. Saunders** (Hrsg). Population Genetics of Bacteria. Cambridge University Press, Cambridge, S. 1-12.
- Maynard Smith, J., Smith, N. H., O'Rourke, M. und B. G. Spratt** (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **90**: 4384-4388.

- Middendorf, L. R., Humphrey, P. G., Narayanan, N. und S. C. Roemer** (2001). Sequencing technology. **C. W. Sensen (Hrsg)**. Genomics and bioinformatics. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Band **5b**, S. 165-208.
- Nordborg, M. und S. Tavaré** (2002). Linkage disequilibrium: what history has to tell us. *TRENDS in Genetics* **18**: 83-90.
- Nübel, U., Bateson, M. M., Madigan, M. T., Kühl, M. und D. M. Ward** (2001). Diversity and distribution in hypersaline microbial mats of bacteria related to *Chloroflexus* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4365-4371.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Clavero, E. und G. Muyzer** (2000). Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environmental Microbiology* **2**: 217-226.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Kühl, M. und G. Muyzer** (1999). Spatial scale and the diversity of benthic cyanobacteria and diatoms in a salina. *Hydrobiologia* **401**: 199-206.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. und G. Muyzer** (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3327-3332.
- Palys, T., Nakamura, L. K. und F. M. Cohan** (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 1145-1156.
- Papke, R. T., Koenig, J. E., Rodríguez-Valera, F. und W. F. Doolittle** (2004). Frequent recombination in a saltern population of *Halorubrum*. *Science* **306**: 1928-1929.
- Papke, R. T., Ramsing, N. B., Bateson, M. M. und D. M. Ward** (2003). Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology* **5**: 650-659.
- Prufert-Bebout, L. und F. Garcia-Pichel** (1994). Field and cultivated *Microcoleus chthonoplastes*: the search for clues to its prevalence in marine microbial mats. In: **Stal, L. J. und P. Caumette (Hrsg)**. Microbial mats - structure, development and environmental significance. Springer-Verlag, Berlin, Band **G35**, S. 111-116.
- Richert, K., Brambilla, E. und E. Stackebrandt** (2005). Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from

- microbacteria, order Actinomycetales. *Journal of Microbiological Methods* **60**: 115-123.
- Roberts, M. S. und F. M. Cohan** (1995). Recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Evolution* **49**: 1081-1094.
- Roberts, M. S. und F. M. Cohan** (1993). The effect of DNA sequence divergence on sexual isolation in *Bacillus*. *Genetics* **134**: 401-408.
- Rodríguez-Valera, F.** (2002). Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environmental Microbiology* **4**: 628-633.
- Rosowski, J. R., Shaffer, J. J., Martin, E. L., Kokjohn, T. A. und K. W. Lee** (1999). First report of a putative cyanophage, MC-1, of *Microcoleus* sp. *Microscopy and Microanalysis* **5**: 1142-1143.
- Rosselló-Mora, R. und R. Amann** (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 39-67.
- Rudi, K., Skulberg, O. M. und K. S. Jakobsen** (1998). Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phylogenetically related strains. *Journal of Bacteriology* **180**: 3453-3461.
- Saitou, N. und M. Nei** (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Santos, S. R. und H. Ochman** (2004). Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environmental Microbiology* **6**: 754-759.
- Schneider, D., Altenfeld, U., Thomas, H., Schrader, S., Mühlenhoff, U. und M. Rögner** (2000). Sequence of the two operons encoding the four core subunits of the cytochrome b6f complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1491**: 364-368.
- Spratt, B. G.** (2004). Exploring the concept of clonality in bacteria. In: **Woodford, N. und A. Johnson (Hrsg)**. Genomics, proteomics, and clinical bacteriology: Methods and reviews. *Methods in Molecular Biology*, Band **266**. Humana Press, New Jersey, S. 323-352.
- Spratt, B. G., Hanage, W. P. und E. J. Feil** (2001). The relative contributions of recombination and point mutation to the diversification of bacterial clones. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 602-606.

- Spratt, B. G. und M. C. J. Maiden** (1999). Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, biological sciences* **354**: 701-710.
- Stackebrandt, E.** (2004). Still a mystery: the prokaryotic species. In: **Watanabe M. K., Suzuki, K.-I. und T. Seki (Hrsg)**. Innovative roles in biological resource centers. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress for Culture Collections, Tsukuba, Japan, S. 75-81.
- Stackebrandt, E. und B. M. Goebel** (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846-849.
- Stackebrandt, E. und O. Päuer** (2005). Gene sequence heterogeneity of *Coralloccoccus coralloides* strains isolated from geographically diverse locations. *Environmental Microbiology* **7**: 1017-1023.
- Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N. und J. G. Holt (Hrsg)** (1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3. Williams & Wilkins, Baltimore, Massachusetts.
- Staley, J. T. und J. J. Gosink** (1999). Poles apart: Biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Review of Microbiology* **53**: 189-215.
- Starr, R. und J. Zeikus** (1987). UTEX - the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology* **23**: 1-47.
- Sullivan, M. B., Waterbury, J. B. und S. W. Chisholm** (2003). Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature* **424**: 1047-1051.
- Tanabe, Y., Kaya, K. und M. M. Watanabe** (2004). Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. *Journal of Molecular Evolution* **58**: 633-641.
- Urbach, E., Scanlan, D. J., Distel, D. L., Waterbury, J. B. und S. W. Chisholm** (1998). Rapid diversification of marine picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). *Journal of Molecular Evolution* **46**: 188-201.
- Urwin, R. und M. C. J. Maiden** (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* **11**: 479-487.



- Vulic, M., Lenski, R. E. und M. Radman** (1999). Mutation, recombination, and incipient speciation of bacteria in the laboratory. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **96**: 7348-7351.
- Walter, M. R. (Hrsg)** (1976). Stromatolites. *Developments in Sedimentology*, Band **20**. Elsevier scientific publishing company, New York.
- Ward, D. M.** (1998). A natural species concept for prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* **1**: 271-277.
- Ward, D. M., Bateson, M. M., Weller, R. und A. L. Ruff-Roberts** (1992). Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. In: **Marshall, K. C. (Hrsg)**. Advances in Microbial Ecology. Plenum Press, New York, Band **12**, S. 219-286.
- Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C. und M. M. Bateson** (1998). A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 1353-1370.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, L., Moore, L. H., Moore, W. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. und H. G. Trüper** (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 463-464.
- Whitaker, R. J., Grogan, D. W. und J. W. Taylor** (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* **301**: 976-978.
- Wieland, A., Kühl, M., McGowan, L., Fourçans, A., Duran, R., Caumette, P., García de Oteyza, T., Grimalt, J. O., Solé, A., Diestra, E., Esteve, I. und R. A. Herbert** (2003). Microbial mats on the Orkney Islands revisited: microenvironment and microbial community composition. *Microbial Ecology* **46**: 371-390.
- Wilmotte, A.** (1994). Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: **Bryant, D. A. (Hrsg)**. The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 1-25.
- Woese, C. R.** (1987). Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* **51**: 221-271.

## 7. Anhang

**Tabelle 7.1 Allelprofile einschließlich Sequenztypen (ST) aller in dieser Arbeit verwendeten Proben**

	ST	Allele		
		rDNA-ITS	<i>kaiC</i>	<i>petB/D</i>
NEY2-379	1	1	1	1
NEY2-380	1	1	1	1
NEY2-381	1	1	1	1
NEY2-382	1	1	1	1
NEY2-388	1	1	1	1
MC-NEY-P2-19	2	1	1	2
FWS-17	2	1	1	2
MC-NEY-P2-17	2	1	1	2
MC-NEY-P2-20	2	1	1	2
MEL-4	3	1	2	3
NEY4-298	4	1	3	2
NEY4-339	4	1	3	2
NEY3-397	5	1	3	3
NEY5-360	6	2	3	4
VAR3-2	7	1	4	3
VAR2-03	8	1	4	2
VAR2-15	8	1	4	2
VAR2-16	8	1	4	2
VAR2-18	8	1	4	2
MC-K25-VAR	8	1	4	2
MC-K26-VAR	8	1	4	2
MC-K28-VAR	8	1	4	2
MC-LF13	9	1	5	4
NEY5-361	10	1	5	2
MC-K6-NEY5	10	1	5	2
WIB-17	11	1	6	2
MEL-20	12	1	7	2
FWS-33	13	1	8	3
MC-K8-FWS	13	1	8	3
MC-K5-NEY4	13	1	8	3
VAR4-10	13	1	8	3
VAR4-12	13	1	8	3
VAR4-3	13	1	8	3
VAR4-6	13	1	8	3
VAR4-9	13	1	8	3
MC-MAF	13	1	8	3
NEY1-325	14	1	8	1
FWS-08	15	1	8	2
FWS-22	15	1	8	2
FWS-31	15	1	8	2
NEY4-350	15	1	8	2
MC-MEL	16	1	9	3
NEY3-407	17	1	9	2
MC-K4-NEY4	18	2	10	2
FWS-11	19	2	1	2
MC-LWP	20	2	2	4
FWS-20	21	2	11	2
VAR2-21	22	2	4	2
VAR2-22	22	2	4	2
MC-K10-VAR	22	2	4	2
FWS-05	23	2	12	2
FWS-06	23	2	12	2
FWS-10	23	2	12	2
FWS-23	23	2	12	2

	ST	Allele		
		rDNA-ITS	<i>kaiC</i>	<i>petB/D</i>
MC-LF12	24	2	5	4
WIB-01	25	2	6	2
WIB-05	25	2	6	2
WIB-06	25	2	6	2
WIB-08	25	2	6	2
WIB-10	25	2	6	2
WIB-13	25	2	6	2
WIB-16	25	2	6	2
WIB-21	25	2	6	2
WIB-25	25	2	6	2
WIB-26	25	2	6	2
WIB-27	25	2	6	2
WIB-28	25	2	6	2
WIB-29	25	2	6	2
WIB-33	25	2	6	2
WIB-38	25	2	6	2
WIB-39	25	2	6	2
WIB-41	25	2	6	2
WIB-42	25	2	6	2
WIB-43	25	2	6	2
WIB-45	25	2	6	2
WIB-50	25	2	6	2
WIB-56	25	2	6	2
WIB-59	25	2	6	2
WIB-67	25	2	6	2
WIB-70	25	2	6	2
WIB-92	25	2	6	2
WIB-93	25	2	6	2
MC-STO	26	2	13	3
MC-SAG	27	2	14	3
MC-WW5	28	2	15	3
VAR5-2	29	2	16	4
MC-K27-FWS	30	2	8	3
MC-K29-FWS	30	2	8	3
NEY1-313	30	2	8	3
MC-K3-NEY3	30	2	8	3
VAR2-04	30	2	8	3
VAR2-20	30	2	8	3
VAR4-11	30	2	8	3
VAR4-2	30	2	8	3
VAR5-1	30	2	8	3
VAR5-3	30	2	8	3
VAR5-5	30	2	8	3
VAR5-6	30	2	8	3
MC-K11-VAR	30	2	8	3
MC-K2-NEY1	31	2	8	4
FWS-18	32	2	8	2
FWS-26	32	2	8	2
NEY1-280	32	2	8	2
NEY1-310	32	2	8	2
NEY1-324	32	2	8	2
NEY1-331	32	2	8	2
MC-K1-NEY1	32	2	8	2
MC-NDN	32	2	8	2

## 7.1 Fortsetzung

	ST	Allele				ST	Allele		
		rDNA-ITS	kaiC	petB/D			rDNA-ITS	kaiC	petB/D
MEL-14	32	2	8	2	COB-31	64	23	32	11
MC-K7-NEY5	33	3	5	2	COB-15	64	22	32	12
VAR4-1	34	4	8	3	COB-37	65	22	33	13
WIB-61	35	5	6	2	COB-33	66	23	33	13
WIB-83	36	6	6	2	COB-41	66	23	33	13
VAR3-3	37	7	17	2	COB-16	67	23	30	14
VAR3-5	37	7	17	2	COB-27	67	23	30	14
MC-SAH	38	8	18	2	COB-29	67	23	30	14
VAR3-6	39	9	3	3	COB-34	68	23	30	13
VAR4-4	39	9	3	3	COB-39	68	23	30	13
VAR4-5	39	9	3	3	SDB2-03	69	20	34	15
WIB-15	40	9	6	2	SDB2-08	70	20	35	16
WIB-18	40	9	6	2	MC-K24-SDB	71	20	36	17
WIB-85	40	9	6	2	GN-03	72	24	37	18
WIB-87	40	9	6	2	GN-12	73	25	38	19
WIB-89	40	9	6	2	GN-11	74	25	38	20
WIB-04	41	10	6	2	GN-17	75	25	39	21
WIB-91	41	10	6	2	GN-16	76	25	39	22
WIB-76	42	11	6	2	NC30-2	77	26	40	23
MC-K9-VAR	43	12	4	2	P6-30	78	27	41	19
NEY2-286	44	13	3	2	P6-28	79	27	42	19
NEY4-296	45	13	4	2	P6-24	80	27	43	19
VAR3-1	46	13	4	3	P5-69	81	27	44	19
FWS-07	47	14	8	3	P5-85	82	27	45	19
WIB-102	48	15	19	5	P6-29	83	27	46	19
WIB-110	48	15	19	5	P6-05	84	27	47	19
WIB-112	48	15	19	5	P4-18	85	27	48	19
WIB-113	48	15	19	5	P6-19	85	27	48	19
WIB-114	48	15	19	5	P6-20	85	27	48	19
WIB-118	48	15	19	5	P6-21	85	27	48	19
WIB-23	48	15	19	5	P4-22	85	27	48	19
WIB-32	48	15	19	5	P6-23	85	27	48	19
WIB-82	48	15	19	5	P6-11	85	27	48	19
WIB-94	48	15	19	5	P6-25	85	27	48	19
WIB-98	48	15	19	5	NC10-222	85	27	48	19
WIB-86	49	15	19	6	P6-12	85	27	48	19
MC-EDA	50	16	20	7	P6-17	85	27	48	19
MC-ASK5	51	17	21	7	P6-18	85	27	48	19
MC-WIS	52	18	22	8	P5-64	85	27	48	19
MC-LZW	53	18	23	8	P5-27	85	27	48	19
VAR3-7	54	18	24	8	P5-28	85	27	48	19
NEY3-289	55	19	25	5	P5-29	85	27	48	19
WIB-116	56	15	26	9	P5-48	85	27	48	19
WIB-24	56	15	26	9	P5-80	85	27	48	19
WIB-30	56	15	26	9	P4-36	85	27	48	19
MC-PCC7420	57	20	27	10	P5-86	85	27	48	19
MC-NCR	57	20	27	10	P5-81	85	27	48	19
NEY5-357	58	2	3	11	P5-84	85	27	48	19
WIB-44	59	15	28	5	NC36-5	86	27	48	19
COB-21	60	21	29	42	P6-27	87	28	48	19
COB-14	61	21	30	5	P3-04	88	29	49	24
COB-22	62	22	31	12	P4-37	89	30	49	25
COB-30	62	22	31	12	P4-39	90	31	49	25
COB-24	63	22	32	11	P2-33	91	32	50	24

## 7.1 Fortsetzung

	ST	Allele		
		rDNA-ITS	<i>kaiC</i>	<i>petB/D</i>
P3-10	92	33	51	24
P2-14	93	34	49	25
P3-02	93	34	49	25
P3-05	94	35	49	25
P3-07	95	36	52	26
P3-01	96	37	52	26
P2-34	97	38	49	25
P3-08	98	39	52	26
P3-09	99	40	49	26
P2-23	100	41	49	25
P2-20	101	42	53	25
P2-19	102	43	54	25
P2-36	103	43	53	25
P2-15	104	43	49	25
P2-16	104	43	49	25
P2-18	104	43	49	25
P2-24	104	43	49	25
P2-25	104	43	49	25
P2-26	104	43	49	25
P2-29	104	43	49	25
P2-30	104	43	49	25
MC-SCI-1a-9	105	44	49	25
NC20-179	106	45	55	27
NC33B-1	107	46	55	27
NC34-4	108	46	55	28
GN-20	109	47	56	29
GN-15	110	47	57	30
GN-19	111	47	58	31
GN-14	112	47	58	30
GN-18	112	47	58	30
MC-K31-GN	113	47	59	31
P5-73	114	48	59	32
P5-72	115	49	59	33
SDB2-19	116	50	60	34
SDB2-21	117	50	61	35
SDB2-13	118	50	62	33
SDB1-12	119	51	63	33
P4-50	120	52	64	33
P4-19	121	53	64	33
MC-K32-SDB	122	53	58	33
SDB1-04	123	54	65	33
NC37-10	124	54	66	33
NC37-11	125	54	64	33
SDB1-01	126	54	59	33
SDB1-02	126	54	59	33
P4-38	127	54	67	33
P5-75	128	55	59	33
P5-65	129	56	64	33
P5-76	129	56	64	33
P5-79	129	56	64	33
P5-66	130	56	68	33
P5-46	131	56	48	33
P5-38	132	56	59	36
P4-40	133	56	59	33
P4-47	133	56	59	33
P4-52	133	56	59	33
P5-21	133	56	59	33
P5-22	133	56	59	33
P5-24	133	56	59	33
P5-25	133	56	59	33
P5-26	133	56	59	33
P5-30	133	56	59	33
P5-31	133	56	59	33
P5-32	133	56	59	33
P5-33	133	56	59	33
P5-34	133	56	59	33
P5-41	133	56	59	33
P5-42	133	56	59	33
P5-44	133	56	59	33
P5-51	133	56	59	33
P5-58	133	56	59	33
P5-68	133	56	59	33
P5-70	133	56	59	33
P5-77	133	56	59	33
P5-83	134	56	59	19
NC30-4	135	57	69	19
MC-Liss2	136	58	70	37
MC-ED-4	137	59	71	38
MC-ED-2	138	60	71	38
MC-ED-3	138	60	71	38
MC-CAM	139	61	72	38
MC-ED-10	140	61	73	39
MC-SC-5a-5	141	62	74	40
MC-SC-5a-6	141	62	74	40
P4-41	142	62	75	41
P4-46	143	62	76	40
P4-51	143	62	76	40
MC-SC-5a-2	144	62	77	40
MC-SCI-100-1	145	62	78	40
MC-SC-1a-7	146	62	79	40
MC-SC-5a-3	146	62	79	40
P4-43	147	63	75	41
MC-TOW	148	64	80	43

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Erko Stackebrandt danken. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, eigenständig zu arbeiten, hatte aber immer ein offenes Ohr, wenn es Fragen oder Probleme gab. Seine Vorschläge und Erklärungen haben mich immer wieder motiviert und mir weitergeholfen. Meinem Betreuer, Herrn Dr. Ulrich Nübel, danke ich für die fortlaufende Unterstützung während der letzten Jahre sowie für viele nützliche Tipps und Tricks im Umgang mit Cyanobakterien und diversen Computerprogrammen. Vielen Dank auch für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn möchte ich für die Übernahme des Koreferates danken.

Des Weiteren gilt mein Dank allen im Labor, die mir mit ihrer ständigen Hilfsbereitschaft geholfen haben, mich im Laboralltag wieder zurechtzufinden und mich in der DSMZ wohl zu fühlen. Ganz besonderen Dank an Evelyne Brambilla, die immer dafür gesorgt hat, dass genug Nährmedium für die *Microcoleus*-Kulturen vorhanden war, Ina Kramer, die mich in die Geheimnisse der Sequenzierung eingeweiht hat und Karin Münch, die mir in den Anfangszeiten alles im Labor gezeigt hat.

Frau Dr. Kathrin Richert danke ich für die vielen hilfreichen Diskussionen und die wirklich geduldige Beantwortung aller Fragen im Zusammenhang mit der Promotion.

Frau Dr. Andrea Wieland, Maike Meemken und Kathrin Witte möchte ich dafür danken, dass sie mir Mattenmaterial beziehungsweise Proben für die Sequenzierung überlassen haben.

Für die fortwährende Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit möchte ich besonders meinen Eltern, Rosmarie und Harald Ladders, meinem Bruder, Sven Ladders, sowie meiner Großmutter, Hildegard Gehlhaar meinen Dank aussprechen. Sie haben nie an mir gezweifelt und mir immer wieder Mut gemacht. Dank auch an Angela Mika und Richard Münch, die zur selben Zeit dieselben Höhen und Tiefen des Doktorandenlebens durchgemacht haben und mit denen ich mich über alles austauschen konnte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen danke ich für die finanzielle Unterstützung.